

INSTITUTUL DE MEDICINA SI FARMACIE - IASI -
DISCIPLINA DE BIOLOGIE CELULARA

Rahed Ali

GHID

de

LUCRARI PRACTICE

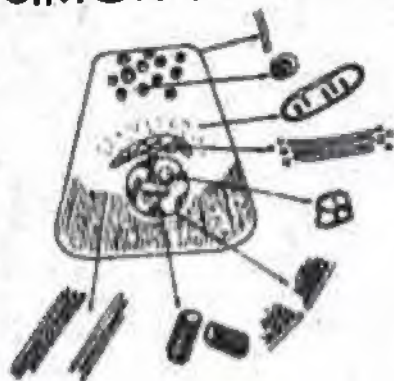
Dr. C. COTRUTZ

in colaborare cu:

Biol. MARIA ADOMNICA

Biol. SILVIA PORUMB

Dr. SIMONA PARASCHIV



IASI - 1981

în colaborare cu

Biol. Adomnică Maria

Biol. Porumb Silvia

Dr. Paraschiv Simona

unelor, mo-
seculară care
tatele dintre

lice și biofizice
n, rezonanța

ția neutroni-

LITOGRAFIA I.M.F. Iași - 1981

ate
te.

Biblioteca I.M.F.

UNIVERSITY

INSTITUTUL DE MEDICINA SI FARMACIE IASI
DISCIPLINA DE BIOLOGIE CELULARA

G H I D

DE

LUCRARI PRACTICE

DR. C. COTRUTZ



1. METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC ÎN MICROSCOPIA FOTONICA

1.1. I n t r o d u c e r e

Informațiile structurale, fiziologice, biochimice, biofizice, matematice, etc. în biologie s-au dovedit a avea o valoare deosebită pentru înțelegerea modului de organizare și funcționare a materiei vii.

Prin intermediul difracției cu raze X s-a elucidat mecanismul replicării A.D.N.-ului, a transcrierii acestei macromolecule, a biosintezei proteinelor, moment în care a luat ființă biologia moleculară care demonstrează cu multă acuratețe relațiile dintre structură și funcție.

Cu ajutorul unor metode biochimice și biofizice cum ar fi rezonanța electronică de spin, rezonanța magnetică nucleară, fluorometria, difracția neutronilor, etc. s-au putut obține în ultimii ani date valoroase despre organizarea structurilor subcelulare.

2

În linii mari, în biologia celulară sînt următoarele metode de studiu :

- A - morfologice
- B - biochimice
- C - fiziologice
- D - biofizice

A. - Metodele morfologice utilizează ca aparate microscopul optic (fotonic sau luminos) și electronic (a se vedea cursul de Biofizică).

1. - Examenul citologic în microscopia fotonică este limitat de puterea de separare sau rezoluție a aparatului (puterea de rezoluție a microscopului fotonic reprezintă cea mai mică distanță la care două puncte pot fi văzute distinct).

Puterea de rezoluție se calculează după formula lui Abbé. (Biofizică).

Se consideră că limita maximă a puterii de rezoluție a microscopului optic este de 0,2 microni, limită care se crede că nu va putea fi depășită.

Prin montarea unor dispozitive speciale, la microscopul optic se poate realiza :

1. + microscopia în contrast de fază permite studiul celulelor în stare vie (celule nefixate și necolorate), scoțînd în evidență unele detalii de structură care nu se pot observa la microscopul optic obișnuit; ea este folosită la studiul celulelor în culturi, a mișcărilor

celulare (cu sau fără deplasare), a reacțiilor celulare la diferiți agenți (fizici sau chimici), etc;

2. + microscopia de fluorescență utilizează radiațiile ultraviolete emise de o lampă cu vapori de mercur; aceste radiații ultraviolete care sînt invizibile, după traversarea unui preparat microscopic devin vizibile. Fluorescența poate fi naturală, produsă de substanțe care se găsesc în mod normal în celulă (auto-fluorescență) și secundară, provocată prin tratarea preparatelor cu anumite substanțe numite fluorocromi (tioflavina, acridin-orange, etc).

Microscopia de fluorescență se utilizează în special în identificarea antigenelor în celule (imuno-fluorescență), în studiul benzilor fluorescente ale cromozomilor, în identificarea unor substanțe din celule, etc.;

3. + microscopia pe fond întunecat sau ultramicroscopia permite examinarea celulelor și bacteriilor în suspensie ; nu se pot observa structuri ci numai particole din citoplasma celulelor vii (este un fenomen similar observării particulelor de praf într-o rază de soare).

(2.) - Citologia în microscopia electronică permite studiul alcătuirii moleculare a structurilor biologice (puterea de rezoluție 1,2 Å).

Există mai multe tipuri de microscopae electronice dintre care două sînt mai utilizate în biologie :

1.- Microscopul electronic de transmisie (T.E.M. - Transmission Electron Microscope) cu ajutorul căruia imaginea ultrastructurală a celulei este proiectată pe un ecran fluorescent;

2. - Microscopul electronic de baleiaj (S.E.M. - Scanning Electron Microscope), utilizat în studiul ultranorfologiei suprafețelor celulare cu ajutorul electronilor secundari sau reflectați.

B. - Metodele citochimice și citoenzimologice se utilizează pentru evidențierea localizării precise a constituenților chimici și enzimatici din celule.

C. - Metodele fiziologice stabilesc experimental rolul funcțional al structurilor celulare.

D. - Metodele biofizice explică fenomenele fizice care se petrec la nivel celular (de exemplu legile fizice după care se realizează transportul prin membrană).

Unitățile de măsură folosite în studiul celulelor sînt :

- 1 micron sau 1 micrometru = 10^{-3} mm
- 1 milimicron sau 1 nanometru = 10^{-6} mm
- 1 Angström = 1/10 milimicroni.

Pentru obținerea unor preparate bune se impune folosirea unor timpi operatori de prelucrare a pieselor a căror cronologie trebuie respectată cu rigurozitate.

În ordinea lor acești timpi sînt :

1.2. Recoltarea pieselor

Recoltarea reprezintă unul din timpii cei mai dificili în tehnica citologică deoarece, cu maximum de operativitate, după sacrificarea animalului de experiență sau obținerea unui preparat prin biopsie sau alt act operator, trebuie să se obțină un fragment de țesut sau organ care să conțină populația celulară ce trebuie studiată.

Recoltarea se face pe o placă de plută sau de P.V.C. foarte curată ; se folosesc pense fine fără dinți care se manipulează cu delicatețe pentru a nu strivi preparatul ; în același scop, la fasonarea pieselor se folosesc lame de ras noi, degresate).



În cazul în care țesutul are o consistență moale (sistem nervos central, testicul) și recoltarea fragmentelor nu se poate face fără riscul strivirii lor, se preferă fixarea unor fragmente mai mari timp de 1-2 ore, perioadă în care structurile superficiale se întăresc și permit fasonarea fragmentelor dorite (pentru citologie, această operație se face la o temperatură de $+ 4^{\circ}\text{C}$).



Piese recoltate trebuie să aibă fețele plane și paralele, cu o grosime de 1-4 mm (grosimea

mică ușurează pătrunderea mai rapidă a fixatorului în piesa de studiat).

1.3. Fixarea și fixatorii citologici

Def. Prin fixare se înțelege manopera care are drept scop oprirea alterării structurilor celulare după scoaterea din organismul viu a unui fragment de țesut; fixarea păstrează forma, structura și compoziția chimică a celulelor vii.

Tipuri de fixan.

1. Agenții fixatori se combină cu numeroase grupe funcționale ale moleculelor proteice care reprezintă partea principală a constituenților celulari, formând macromolecule insolubile în lichidele utilizate de tehnicile de includere.

Prin coagularea proteinelor de către agenții fixatori se blochează reacțiile enzimatică, împiedicându-se în acest fel distrugerea autolitică a celulelor.

Condiții Un bun fixator citologic trebuie să îndeplinească următoarele condiții :

- a) să pătrundă rapid în țesut ;
- b) să producă o retracție cât mai mică a pieselor evitând modificarea taliei, formei și raporturilor dintre celule ;
- c) să permită o bună includere la parafină

Fixarea se realizează prin :

- I. agenți fizici || - desicare
|| - criodesicare
- II. agenți chimici || - fixatori simpli
|| - amestecuri fixatoare

I. Agente fizici

a) desicarea sau uscarea este folosită în special în tehnica hematologică. (vezi capitolul 3).

b) criodesicarea sau uscarea sub vid ("freeze drying" al autorilor anglo-saxoni) este o metodă care permite obținerea cu un minimum de alterări celulare a unor secțiuni fine în care structurile sînt păstrate fără modificări chimice importante.

Timpii criodesicării sînt :

1 + congelarea bruscă în azot lichid a unui fragment de țesut proaspăt ;

2 + desicarea lui sub vid și la o temperatură suficient de coborîță pentru ca apa tisulară să treacă direct din starea solidă în starea de vapori (liofilizare) ; prin această manoperă se evită difuzarea substanțelor din țesuturi.

3 + impregnarea directă cu parafină sub vid a țesutului uscat.

II. Agente chimici

1. Fixatori simpli. În tehnicile de citologie se folosește fără adjuvanți o singură substanță:

tetraoxidul de osmiu (OsO_4), impropriu denumit acid osmic. Conservă foarte bine structurile celulare dar are dezavantajul că pătrunde foarte încet în piesă (0,5 mm în 24 ore).

În soluție apoasă este folosit în conservarea mitocondriilor și a complexului Golgi, iar sub formă de vapori pentru fixarea țesuturilor.

Datorită fixării lente, a costului ridicat, a toxicității sale (conjunctivite), tetraoxidul de osmiu are o utilizare redusă în microscopia fotonică.

2) Amestecuri fixatoare se împart în patru grupe :

a) Amestecurile cromo-osmice conservă foarte bine structurile nucleare, centrozomii, aparatul fuzorial, diferențierile membranei celulare ca marginea în perie, platoul striat și cilii.

Timpul optim de fixare este de 12 - 24 ore.

Retracțiile sînt mici și piesele se pot include în parafină. Principalele amestecuri cromo-osmice sînt următoarele : Flemming, Benda, Champy, Nasonov, Benoit, etc.

b) Amestecurile cromice fără OsO_4 și acid acetic, sînt folosite pentru studiul mitocondriilor și permit impregnarea argentică a complexului Golgi. Dintre acestea mai folosite sînt amestecurile fixatoare: Orth, Kopsch, Regaud, Helly, Maximov, etc.

Timp optim de fixare 6 - 24 ore.

c/ Amestecurile pe bază de metale grele în afară de crom și OsO_4 conservă mitocondriile și permit împregnarea argentică a complexului Golgi. Din aceste amestecuri se cunosc următorii trei fixatori: Ramon y Cajal, Da Fano și Aoyama.

Timp optim de fixare 3 - 25 ore.

d/ Amestecuri cromo-acetice se folosesc în studiul granulelor de secreție a ergastoplasmei, a ciliilor și în cercetări de cariologie. Se cunosc fixatorii: Tellyesniczky, Kolmer, Sanfelice, etc.

Alți fixatori

În cercetarea biologică, în afara celor patru grupe de amestecuri fixatoare descrise mai sus, se utilizează cu rezultate asemănătoare și alți fixatori. Aceștia sînt:

1. Formol - calciu BAKER, un bun fixator pentru mitocondrii și complexul Golgi.

2. Fixatorii CLARKE și CARNOY, conservă foarte bine ergastoplasma.

3. Fixatorii BOUIN, SUSA, HEIDENHEIM, sînt utilizați în studiul produsilor de secreție celulară.

Nici-un fixator citologic nu este universal și de aceea arta fixării constă în alegerea corectă a amestecului, în raport de ceea ce trebuie studiat.

(Tabel nr. 1).

Pentru o bună fixare este necesar să se țină seama de următoarele reguli:

a/ evitarea alterărilor autolitice printr-o

Tabel nr. 1.

ORGANITUL CELULAR SI FIXATORUL INDICAT

ORGANIT	FIXATORII UTILIZATI
Nucleul	Helly, Newcomber, Carnoy, Zenker, Maximov.
Nucleolul	Sanfelice și fixatori pe bază de trioxid de crom, formol.
Complex Golgi	Cajal, Da Fano, Aoyama, Champy, formol-calciu.
Mitocondria	Orth, Kopsch, Regaud, Kolster, formol-calciu.
Ergastoplasma	Tetraoxid de osmiu, Bouin, Susa, Clarke, Carnoy.
Centrozomul	Fixatori cromo-osmici, Bouin, Susa, Clarke, Carnoy.
Marginea în perie Platou striat Cilii.	Amestecuri cromo-osmice, Carnoy
Granule de secreție	Orth, Bouin, Helly.

1.1

fixare cît mai rapidă după moartea, puncția biopsia sau exereza unui organ;

b/ prelevarea corectă a pieselor;

c/ utilizarea unor flacoane cu fundul plat pe care se așează o hîrtie de filtru sau tifon ; flacoanele trebuie să fie suficient de încăpătoare și să permită introducerea unei cantități suficiente de fixator (aproximativ de 40-50 ori mai mare decît al fragmentului de fixat).

d/ agitarea pieselor din timp în timp, în primele ore ale fixării pentru a menține aceeași compoziție chimică a fixatorului care vine în contact cu fragmentul de țesut;

e/ durata fixării variază de la cîteva ore la cîteva zile, în funcție de fixatorul utilizat, structura și dimensiunile pieselor.

1.4. O p r i e a f i x ă r i i

Se realizează prin eliminarea fixatorului în exces spălînd piesa fixată în apă curgătoare (12-24 ore) sau direct în alcool (în cazul folosirii fixatorilor pe bază de alcool - Carnoy).

1.5. I n c l u d e r e a î n p a r a f i n ă

Pentru o includere corectă sînt necesari patru timpi:

1. deshidratarea pieselor din care s-a eliminat fixatorul în exces;

2. clarificarea și impregnarea lor cu un lichid miscibil cu parafina;

3. impregnarea cu parafină ;

4. turnarea blocului.

1. Deshidratarea este un timp necesar deoarece apa nu este miscibilă cu parafina.

Pentru deshidratare se folosesc : alcoolul etilic, acetona, dioxanul, etc.

Deshidratarea cu alcool etilic se realizează prin trecerea pieselor în băi cu alcooluri de concentrație crescândă. Pentru cercetări de citologie se folosește câte o baie de alcool de 50°, 70°, 80°, 96° și trei băi de alcool absolut.

Pentru piese cu o grosime de 5 mm, durata deshidratării este de câteva ore (5-8 ore). Când piesele au fost fixate într-un lichid pe bază de alcool, deshidratarea începe cu alcoolul absolut (Carnoy).

2. Clarificarea care urmează deshidratării, are drept scop îndepărtarea din piesă și înlocuirea lui cu o substanță miscibilă cu parafina cu care urmează să fie impregnată piesa.

Pentru clarificare, piesele deshidratate sînt trecute prin trei băi succesive de : xilen, benzen, toluol sau alcool amilic, durata optimă fiind de 5-8 ore pentru piese cu o grosime de 3-4 mm și de 30 minute - 1 oră pentru un fragment bioptic.

La sfîrșitul clarificării, piesa capătă un oarecare grad de transparență.

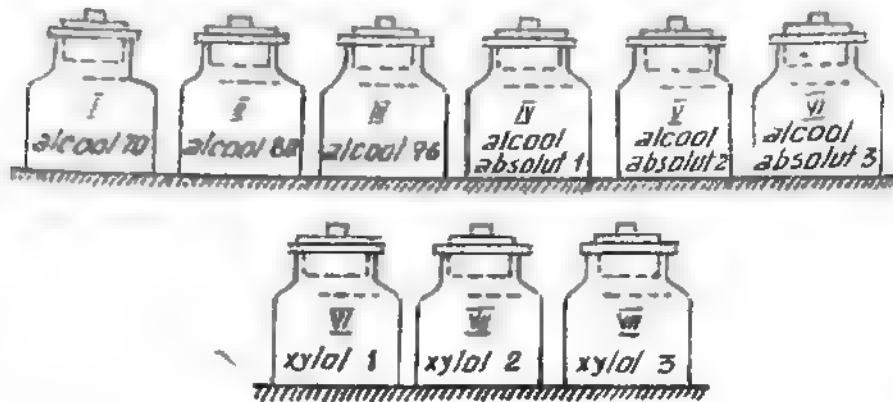


Fig. 1. - Baterie pentru includere la parafină

3. Impregnarea cu parafină se face într-un termostaț la temperatura de 56°C , în care trecem piesele prin trei băi de parafină topită.

Parafina pentru impregnare conține 5 - 10 % ceară de albine care modifică consistența blocului, permițînd o bună secționare a țesutului inclus.

Durata optimă pentru o impregnare corectă este de 18-24 ore, adică 6-8 ore pentru fiecare baie.

În cazul utilizării includerii sub vid, durata impregnării este mult mai mică.

4. Turnarea blocului sau includerea propriu-zisă

Se toarnă parafina topită într-o formă de metal sau hîrtie, puțin mai mare decît piesa; cu o pensă încălzită se scoate fragmentul de țesut din ultima baie și se introduce în parafina turnată anterior, avînd

grijă ca ea să fie orientată cu suprafața care va fi secționată spre fundul formei.

După răcirea și întărirea blocului, includerea se consideră încheiată și se poate trece la timpul ulterior.

1.6. Secționarea blocurilor

Secționarea blocurilor se face cu ajutorul unui aparat numit microtom de parafină cu care se pot realiza secțiuni de 3 - 5 microni.

Blocul de secționat se fixează pe un port obiect care se montează la microtom (Fig. 2).

În jurul piesei se lasă o bandă de parafină groasă de maximum 1 - 2 mm.

Blocul împreună cu port-obiectul microtomului suferă la fiecare învîrtire a roții microtomului o dublă mișcare : una de înaintare realizată cu ajutorul unui șurub micrometric cu care se reglează grosimea secțiunilor și o mișcare verticală prin care piesa întâlnește cuțitul fix al microtomului.

1.7. Lipirea secțiunilor pe lamă. În vederea prelucrării lor ulterioare (colorare) secțiunile sînt aplicate pe un port-obiect de sticlă sau lamă perfect uscată, cu dimensiunile de 76/26 mm și grosimea de 1 - 1,5 mm. Pentru a nu fi îndepărtate în timpul manevrelor ulterioare, secțiunile sînt lipite pe

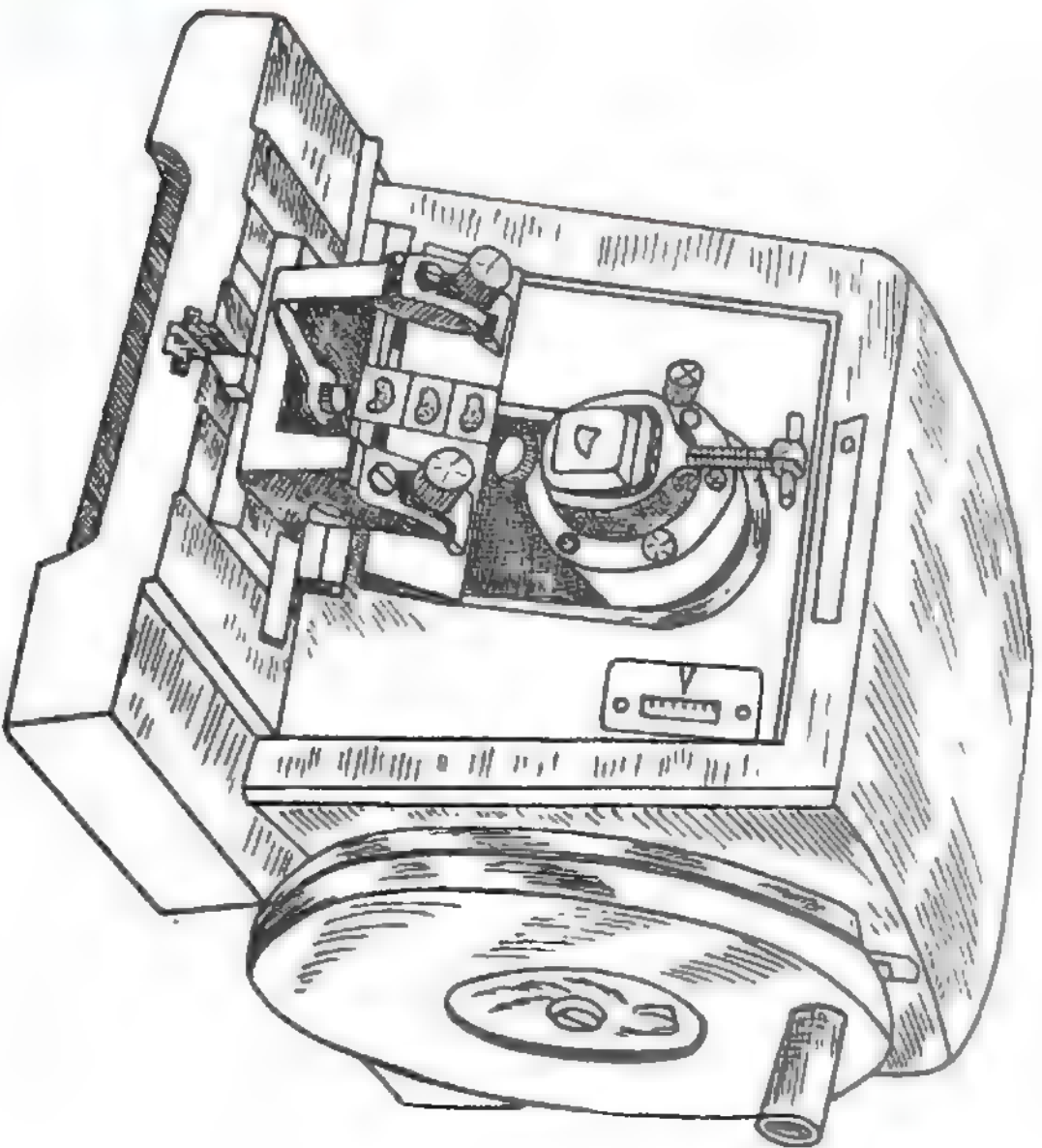


Fig. 2. Microtomul de parafină și poziția
blocului de parafină față de muchia
cuțitului.

port-obiect prin intermediul unei pelicule fine de albumină Mayer (albuș de ou și glicerină în părți egale) sau o soluție apoasă de gelatină 0,1 - 0,2 %.

Etalarea secțiunilor pe lamă se face pe o platină încălzitoare și durează câteva secunde. Se îndepărtează apoi apa iar lamele puse oblic pe un stativ de lemn se introduc într-un termostat la 37°C , unde timp de 24 ore se desăvârșește uscarea și lipirea secțiunilor.

În vederea colorării propriu-zise, secțiunile se deparafinează prin trecerea lor prin trei băi de xilol, benzen sau toluol ; solventii parafinei sînt îndepărtați trecînd lamele cu secțiuni prin trei băi de alcool de concentrații descrescînde de unde sînt introduse apoi într-un pahar cu apă (hidratate).

2. COLORAREA SI COLORANTI IN CITOLOGIE

2.1. I n t r o d u c e r e

6 Colorarea constituenților celulari este un fenomen foarte complex în care intervin factori fizici și mecanisme chimice.

6 Colorarea este o metodă necesară deoarece examinarea preparatelor proaspete, adică nefixate și ne-colorate nu oferă detalii structurale necesare studiului citologic.

2.2. C o l o r a n ț i i

Coloranții citologici sînt de obicei produși de natură organică, capabili să coloreze o substanță sau un grup de substanțe dintr-o celulă conferindu-le culori specifice.

Pentru îndeplinirea acestui deziderat, sînt necesare două proprietăți :

1) a/ colorantul să posede grupări atomice speciale care-i conferă colorarea, grupări care sînt numite "cromofore";

2) b/ să conțină grupări care-i permit o fixare permanentă pe substanța de colorat din celulă ; aceasta se numește "grupare auxocromă"

Marea majoritate a coloranților utilizați în biologie sînt produși organici de sinteză. Compușii organici prevăzuți cu grupări cromofore se numesc "cromogene".

Principalele grupe cromofore responsabile de caracterul colorat al coloranților biologici uzuali sînt : grupa azo, azină, de tip indamină sau tiazină, gruparea nitro și nucleu aromatic sub formă chinonică.

2.3. Clasificarea coloranților

Coloranții utilizați în biologia celulară se pot clasifica în mai multe criterii.

1) După origine :

+ naturali, de origine naturală sau vegetală (ex.: safranina, indigoul, carminul, orceina, hematoxilina);

+ sintetici, (ex.: albastru de metil).

2) După comportamentul în soluție

+ coloranți acizi sau anionici care se atașează de structurile subcelulare încărcate pozitiv ; ei colo-



rează citoplasma celulară (coloranți citoplasmatici ca de ex. : euzina, fuxina acidă, verdele de lumină, etc.).

(+ coloranți baziici sau cationici care se atașează de structurile subcelulare încărcate negativ ; colorează structurile nucleare și de aceea se numesc coloranți nucleari (de ex. : hemalaunul, fuxina bazică, albastrul de toluidină, etc).

(+ coloranți neutri ,rezultă din amestecul în anumite proporții a unui colorant bazic și acid și colorează unele incluziuni citoplasmatiche cu reacție neutră (ex. : eozinatul de azur de metilen, eozinatul de albastru de metilen).

2.4. Mecanismele colorării

Mecanismele fixării coloranților pe structurile celulare sînt foarte complexe, intervenind factori fizici și mecanisme chimice.

De exemplu, în reacțiile histochimice proprii fiecărei grupe de substanță intervin mecanisme chimice.

Unele reacții și colorații se realizează prin factori fizici. Aceștia sînt :

(+ pătrunderea pur mecanică a colorantului în interiorul unor structuri tisulare, prin osmoză sau capilaritate;

+ adsorbția întilnită în colorațiile diferențiale ale diferitelor elemente dintr-un țesut (unii ioni

sînt adsorbiți mai ușor decît alții);

+ absorbția, legată de structura fizică a constituenților celulari.

2.5. Principalele metode de colorare

1. după numărul coloranților utilizați, colorațiile se împart în două grupe:

+ simple cînd se folosește un singur colorant, destinat punerii în evidență a nucleilor sau a altor structuri;

+ combinat care asociază doi sau mai mulți coloranți, în vederea colorării diferențiate a diverselor elemente dintr-un țesut (de ex.: hematoxin-eozină).

2. după modalitățile de colorare se disting:

+ colorații progresive cînd se oprește colorarea în momentul în care preparatul a ajuns la tenta dorită; oprirea se face prin spălare ;

+ colorații regresive ; secțiunea este supracolorată iar apoi excesul de colorant se elimină cu ajutorul unui diferențiator ; în final vor rămîne colorate selectiv mai multe structuri (ex.: colorația Nissl);

+ colorații pe bloc atunci cînd piesele sînt colorate înainte de a fi incluse în parafină; sînt utilizate în impregnările metalice;

+ colorații pe secțiuni; colorarea secțiunilor lipite pe lame port obiect sau libere în soluția colorantă;

+ colorații directe în care colorantul vine în

contact direct cu secțiunea ;

+ colorații indirecte sau colorații prin mordan-
sare în care, pentru obținerea colorației este necesară
prezența unui mordant (substanță care sensibilizează
țesutul la acțiunea colorantului).

2.6. Colorarea cu hematoxi- lin-eozină

Este cea mai utilizată colorație și are drept
scop evidențierea în mare, a structurilor celulare,
a identificării țesuturilor.

Deși nu este o colorație citologică, ea pune
în evidență o serie de aspecte structurale orientative,
pentru un examen histologic sau anatomo-patologic de
rutină.

Timpii colorației sînt următorii :

+ deparafinarea secțiunilor în trei băi de xilol,
toluol sau benzen ;

+ eliminarea solventului parafinei prin trecerea
secțiunilor prin trei băi cu alcooluri de concentra-
ție crescîndă (100% , 96% , 70%);

+ eliminarea alcoolului prin apă curgătoare;

+ introducerea secțiunilor hidratate într-o solu-
ție de hemalaun (hematoxilină + iodat de potasiu +
alaun de potasiu) timp de 5-10 minute;

+ spălare cu apă curgătoare 2-5 minute;

+ introducerea secțiunilor timp de 1-2 minute
într-o baie cu soluție apoasă de eozină 1%;

+ spălarea secțiunilor timp de cîteva secunde în
apă distilată ;

Curc 1+2
22

+ deshidratarea în alcooluri de concentrație crescândă pînă la alcool absolut;

+ clarificarea secțiunilor în trei băi cu xilol, timp de 5-10 minute;

+ montarea ; pe secțiunile colorate și clarificate se pune o picătură de balsam de Canada peste care se așează o lamelă de sticlă.

Rezultate : nucleii apar colorați în albastru violet, nucleolii în roșu, iar citoplasma în roz.

Etichetarea preparatului se face prin aplicarea unei etichete pe care se trece numărul de înregistrare din condica de lucru și țesutul sau organul recoltat și colorația făcută.

3

METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC IN MICROSCOPIA FOTONICA

Studiul caracterelor morfologice, chimice și enzimatic se poate realiza și pe frotiuri și amprente.

3.1. Frotiul

Se realizează prin întinderea celulelor care se găsesc în suspensie într-un mediu lichid (sînge, spută, puroi, spălături gastrice, lichid pleural și peritoneal, etc) pe o lamă port-obiect.

Cel mai utilizat este frotiul cu material biologic fixat și colorat (frotiul de sînge).

3.2. Frotiul de sînge

Se face pe lame port obiect și comportă următorii timpi:

3.2.1. Prelevarea sîngelui se face prin punc-

at

ționarea părții laterale a pulpei degetului inelar sau medius cu un ac de injecție subcutanată bine sterilizat. Pielea se dezinfectează și se degresează cu o compresă îmbibată în alcool sau eter.

Se apucă degetul subiectului cu mâna stângă fixându-l între index și police și se înțeapă cu acul ținut în mâna dreaptă printr-o mișcare rapidă.

Prima picătură de sînge se șterge cu o compresă uscată deoarece ea poate conține lichide tisulare sau impurități de pe piele.

3.2.2. Efectuarea frotiului propriu zis

Constă în întinderea pe o lamă de sticlă perfect curată a picăturii de sînge într-un strat subțire, uniform. A doua picătură de sînge care apare pe pulpa degetului, se ridică cu marginea mică a unei lame șlefuite și se aplică pe una din extremitățile unei lame port-obiect așezată orizontal.

In momentul contactului cu lama port-obiect, se imprimă lamei pe care se află picătura de sînge o mișcare de lateralitate, pentru ca sîngele să se întindă pe linia de contact.

Este bine ca între cele două lame să se formeze un unghi de 35° după care se imprimă lamei șlefuite o mișcare de translație în lungul lamei port obiect. (fig.3).

Grosimea frotiului de sînge depinde de :

+ mărimea picăturii de sînge (picătură mică - frotiu subțire);

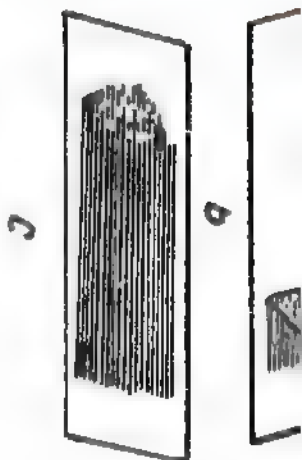
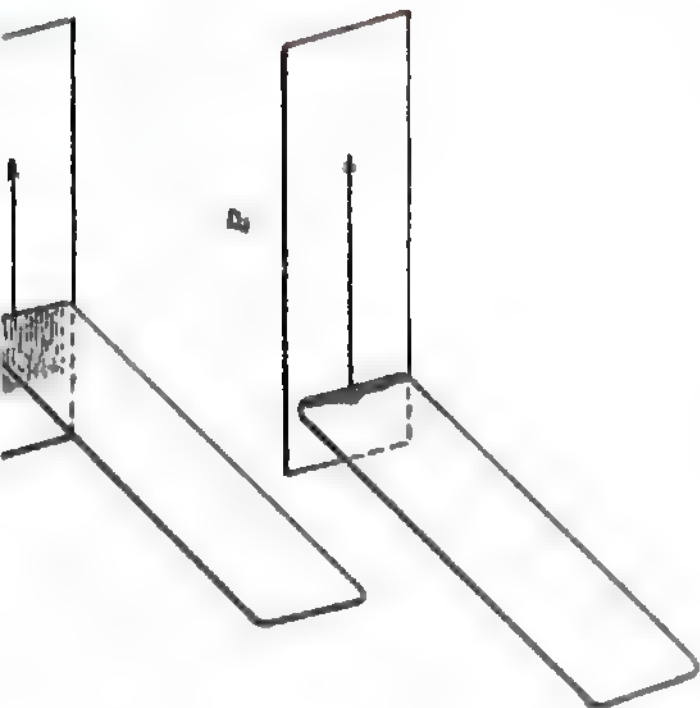


Fig. 3. Tehnica efectuării frotiului de sânge

mm



25

+ unghiul pe care-l formează lama gîlfuită cu lama port obiect (este cu atît mai subţire cu cît acest unghi este de $30-35^{\circ}$);

+ viteza de întindere (printr-o viteză mare se obţine un frotiu gros).

Un bun frotiu trebuie să fie subţire, să nu acopere toată lama, să aibă două margini laterale şi să se termine în franjuri.

3.2.3. Fixarea frotiului se face prin :

a/ uscarea sau desicarea frotiului imediat după confecţionarea sa; se face la temperatura camerei prin agitarea lamei (frotiu uscat); colorarea trebuie făcută cît mai repede posibil pentru a preveni alterările celulare şi modificarea afinităţilor tinctoriale;

b/ soluţii fixatoare (frotiu umed) ca alcoolul etilic absolut timp de 15 minute, alcool etilic absolut şi eter în părţi egale timp de 5-15 minute, alcool metilic timp de 2 minute sau prin vapori de OsO_4 (soluţie 2%).

3.2.4. Colorarea frotiului sanghin

Se face cu metoda May-Grünwald-Giemsa sau coloraţia panoptică Pappenheim.

Tehnica este următoarea:

+ lamelle cu frotiul în sus se aşează pe suporturi din bare de sticlă aşezate paralel, în cutii Petri;

+ se acoperă frotiul cu un număr de picături din soluția May-Grünwald (eozinat de albastru de metilen) ținută trei minute, timp în care alcoolul metilic din soluție face fixarea preparatului;

+ se adaugă apoi un număr egal de picături de apă distilată neutră și se omogenizează cu o pipetă Pasteur; se lasă încă două minute, timp în care soluția hidro-alcoolică May-Grünwald acționează ca un colorant;

+ se îndepărtează soluția May-Grünwald prin înclinarea lamei și, fără spălare, se acoperă frotiul cu soluția Giemsa diluată (1-2 picături la 1 ml apă distilată neutră); după 20 secunde se îndepărtează și frotiul se acoperă din nou cu soluția Giemsa diluată care se ține 20-30 minute;

+ spălarea frotiului la un jet de apă;

+ diferențierea în apă distilată neutră timp de 1 minut;

+ se așează lamele pe un stativ și se așteaptă uscarea lor.

Examinarea frotiului se face la microscopul fotonic utilizând obiectivul de imersie.

R e z u l t a t e

- Eritrocitele au o culoare cărămie
- Nucleii au o culoare violacee
- Nucleolii se colorează în albastru palid
- Granulațiile euzinofile se colorează în portocaliu iar cele bazofile în albastru-negru; neurofilele

în maron-închis iar azurofilele în roșu purpuriu.

Colorația May-Grünwald Giemsa colorează în violaceu dezoxiribonucleoproteinele (A.D.N.) iar ribonucleoproteinele (A.R.N.) în diverse nuanțe de albastru.

3.3. Frotiurile din material biologic provenit din organe ușor accesibile și care prezintă în mod fiziologic o descuamare permanentă sau intermitentă

Acestea se fac din secrețiile vaginale, mamare, bronsice, prostatice și celulele provenite din epitelile mucoaselor bucală, nazală, oculară.

Cu ajutorul unor spatule din sticlă sau metal, tampoane de vată sau tifon, se recoltează secrețiile care se etalează într-un strat subțire pe lame port-obiect degresate. Imediat după întinderea frotiului, fără a-l usca, lamele se introduc într-un amestec alcool-etilic absolut și eter în părți egale timp de 15 minute. Se pot folosi și alte amestecuri fixatoare în raport de ceea ce dorim să obținem.

După fixare, frotiurile se pot colora cu May-Grünwald Giemsa sau hematoxilină-eozină.

3.4. Frotiurile cu material biologic provenit din organe mai puțin accesibile

Se fac din spălături gastrice, lichid pleural și peritoneal (pleurezie, ascită) etc.

În cazul în care aceste probe nu pot intra în lucru imediat, pentru conservarea celulelor este necesară fixarea lor. Cel mai bun fixator universal pentru fluide este soluția de alcool etilic 50%. Pentru aspiratele gastrice se folosește alcoolul etilic 95%.

Produsele care urmează a fi examinate, fixate sau nu, se centrifughează la 1500-4000 rotații / minut timp de 10-30 minute. După centrifugare lichidul supernatant se îndepărtează iar din sediment cu o ansă sau pipetă se ia o picătură și se întinde pe o lamă degresată pe care s-a întins un strat subțire de albumină Mayer. Chiar dacă lichidele biologice recoltate au fost fixate cu soluția de alcool etilic 50%, frotiurile umede obținute din ele se fixează timp de 15 minute cu alcool etilic absolut - eter în părți egale.

3.5. Amprentele de organe

Organul de examinat se secționează transversal prin zona care prezintă interes pentru diagnostic.

3.4. Frotiurile cu material biologic provenit din organe mai puțin accesibile

Se fac din spălături gastrice, lichid pleural și peritoneal (pleurezie, ascită) etc.

În cazul în care aceste probe nu pot intra în lucru imediat, pentru conservarea celulelor este necesară fixarea lor. Cel mai bun fixator universal pentru fluide este soluția de alcool etilic 50%. Pentru aspiratele gastrice se folosește alcoolul etilic 95%.

Produsele care urmează a fi examinate, fixate sau nu, se centrifughează la 1500-4000 turații / minut timp de 10-30 minute. După centrifugare lichidul supernatant se îndepărtează iar din sediment cu o ansă sau pipetă se ia o picătură și se întinde pe o lamă degresată pe care s-a întins un strat subțire de albumină Mayer. Chiar dacă lichidele biologice recoltate au fost fixate cu soluția de alcool etilic 50%, frotiurile umede obținute din ele se fixează timp de 15 minute cu alcool etilic absolut - eter în părți egale.

3.5. Amprentele de organe

Organul de examinat se secționează transversal prin zona care prezintă interes pentru diagnostic.

Secționarea se face cu un bisturiu sau o lamă ascuțită pentru a evita deformarea sau strivirea țesuturilor.

Cu ajutorul unei pense se prinde fragmentul ales și se apasă ușor cu fața secționată pe lama port-obiect degresată. Se fixează cu alcool etilic absolut - eter în părți egale timp de 15 minute. Amprenta fixată se usucă și se colorează cu May Grünwald Giemsa.

I.P. 4:

4. METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC ÎN MICROSCOPIA FOTONICĂ

4.1. Indicațiile sectionă- rii la gheață și criotom

Cu ajutorul microtomului de congelare și crio-
tomului se pot obține :

- / + secțiuni de țesut proaspăt, nefixat;
- / + secțiuni de țesut fixat.

a/ Secțiunile de țesut proaspăt, nefixat se
fac:

+ când se impune un diagnostic anatomo-patologic *la cerere*
* urgent (examen extemporaneu) care se poate pune în *moment*
15-30' ; de acest diagnostic depinde tehnica opera-
torie;

+ cercetarea histochimică a unor substanțe ca de
exemplu grăsimile care sînt solubile în substanțele
folosite în tehnica de includere la parafină (xilen,
toluol, benzen, etc);

+ în cercetări de histoenzimologie.

b/ Secțiunile de țesut fixat au indicații numeroase. Printre cele mai importante amintim:

+ examenul extemporaneu făcut pe fragmente introduse rapid în formol cald; procedeul este brutal dar dă rezultate mulțumitoare;

+ unele cercetări histochimice (catecolamine, vitamina D, etc).

+ unele cercetări neurohistologice (metoda Benda-Spielmayer pentru mielină, Bielschowsky-Gross pentru terminațiile nervoase, etc.).

4.2. T e h n i c a s e c t i o n ă r i i l a m i c r o t o m u l d e c o n g e l a r e

Pe port obiectul microtomului se aplică o rondelă de hîrtie de filtru bine îmbibată cu apă.

Pieseile fasonate din țesutul sau organul proaspăt, nefixat se așează pe rondela de hîrtie de filtru umezită, fără a mai executa alți timpi. Fragmentele din țesut sau organ care au fost fixate în prealabil (cel mai utilizat fixator este formolul) trebuie bine spălate înainte de secționare deoarece, devin foarte sfărîmicioase.

Se va căuta pe cît posibil ca piesele să nu fie mai groase de 0,5 - 0,8 cm. și să aibă suprafețele paralele.

Inghețarea se face cu bioxid de carbon care se

găsește sub presiune în butelii metalice.

Se acoperă piesa și port-obiectul cu un pahar de sticlă și se deschide cu intermitență robinetul buteliei pînă cînd se formează atîta zăpadă carbonică cît să acopere preparatul.

Secțiunile se culeg de pe cuțit cu pulpa degetului printr-o mișcare de la bază spre tăiugul cuțitului, și se pun într-un recipient cu apă.

În cazul în care secțiunile nu pot fi prelucrate (colorate) ele pot fi păstrate în formol 10% la temperatura camerei sau la $+ 4^{\circ}\text{C}$ timp de 1-2 zile.

4.3). Colorarea pentru examenul extemporaneu.

Secțiunile aflate în recipientul cu apă distilată sînt trecute cu ajutorul unei fine baghete de sticlă în "L" într-un Petri în care se află o soluție 0,5-1 % albastru de metilen sau albastru de toluidină.

Se lasă cîteva minute după care se spală într-un vas cu apă distilată, se pescuiesc pe o lamă port-obiect și se montează în glicerină.

R e z u l t a t e

După colorarea cu albastru de metilen, nucleii apar în albastru închis iar citoplasma în albastru deschis.



4.4. Lipirea secțiunilor

Lamele port-obiect după ce au fost acoperite cu un strat subțire de albumină Mayer, se lasă să se usuce la temperatura camerei timp de 15-30 minute. Se introduce oblic în vasul cu apă distilată unde se găsesc secțiunile care se pescuiesc pe lame cu ajutorul unei baghete de sticlă.

Se elimină excesul de apă prin sugativare și presare ușoară cu o hîrtie de filtru, iar degradarea preparatului se evită prin colorarea lui rapidă.

Tehnica secționării la gheață se folosește la ora actuală doar pentru lucrări de rutină. Pentru cercetările citologice de finețe se folosesc tehnicile de secționare la criotom, crio-desicare (congelare-deshidratare) și congelare disoluție (congelare substituție)

4.5. Tehnica secționării la criotom

Se deosebește față de tehnica precedentă prin faptul că la acest aparat secționarea nu este influențată de temperatura ambientă iar cuțitul și proba sînt menținute la o temperatură constantă de -12°C ... -30°C .

Aparatul este compus dintr-un microtom asemănător cu cel de parafină amplasat într-o incintă izotermă răcită de un agregat frigorific cu freon.

4.5.1. Tehnica de lucru

+ fragmentul de țesut sau de organ nefixat așezat pe o rondă de hârtie de filtru bine umezită este pus pe port-obiectul criotomului;

+ port-obiectul cu piesa așezat vertical pe un suport metalic, este introdus într-un recipient special care conține un lichid refrigerent (în mod obișnuit azot lichid: temperatura 196°C);

+ secționarea la grosimea de 5-10 microni ;

+ secțiunile care rămân întinse pe cuțit se plasează pe lame port-obiect, prin simplul contact dintre acestea și secțiune.

4.5.2. Indicațiile criotomiei

+ cercetări de citochimie;

+ cercetări de citoenzimologie ;

+ cercetări de imunofluorescență.

4.6. Crio-desicarea

(congelare - deshidratare).

Principiul acestei metode precum și timpii ei au fost descriși la capitolul 1.3.

Indicațiile crio-desicării. Permite obținerea cu un minimum de alterări celulare a unor secțiuni subțiri și uniforme în care sînt conservați constituenții chimici. Pentru aceste motive metoda este folosită în studiul citologic și citoenzimologic. În his-

techinie, metoda este folosită numai în studiul cariei
laminelor.

4.7. Metoda de congelare - substituție

Principiul acestei metode este foarte apropiat
de cel al metodei de congelare-deshidratare; conser-
varea substanțelor din celule este echivalentă. *la Bell*

4.7.1. Timpii de lucru.

- + Congelarea bruscă a unui fragment de țesut sau organ în azot lichid;
- + Substituția ghiștii prin transferul ei în alcool etilic absolut la temperaturi joase de -40°C până la -70°C timp de aproximativ 7 zile.
- + piesa împreună cu alcoolul în care s-a făcut substituția se lasă să revină la temperatura camerei;
- + includerea la parafină ;
- + secționarea ;
- + colorarea;

4.7.2. Indicațiile metodei

Prin această metodă se obține o foarte bună con-
servare a structurilor citologice și o conservare a
numeroși componenți chimici.

Prin substituția în acetonă s-au putut evidenția
numeroase activități enzimatie: fosfataza alcalină

și acidă, succindehidrogenaza, adenozintrifosfataza, etc.

Se conservă foarte bine acizii nucleici și glicogenul.

L.P.S.

5. METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC ÎN MICROSCOPIA ELECTRONICĂ

Prelevare, fixare, deshidratare și includere

5.1. Introducere

Unul din aparatele moderne indispensabile cercetării fundamentale și aplicative este microscopul electronic. Cu ajutorul lui se poate realiza:

- + examinarea curentă de rutină a celulelor și țesuturilor ;
- + studierea organelor celulare prin tehnica de fracționare diferențiată ;
- + localizarea unor molecule prin tehnici de ultra-citochimie ;
- + localizarea unor activități enzimatică ;
- + reacții imunochimice la nivel ultrastructural,
etc.

Tehnicile folosite în citologia fotonică sînt inproprii cînd prelucrăm un fragment de țesut sau

organ care urmează a fi examinat cu ajutorul microscopului electronic.

În cele urmează vom descrie tehnica folosită în laboratorul nostru de Microscopie Electronică.

5.2. P r e l e v a r e a

Pentru prevenirea modificărilor de orice natură la nivel celular, este recomandat ca probele de material biologic să fie recoltate din organismul viu sau imediat după sacrificarea animalului de experiență. (fixare post vitală).

Cele mai bune rezultate se obțin atunci când țesuturile și organele sînt perfuzate cu fixator ~~în~~ înaintea sacrificării animalului de experiență, adică în introducerea lichidului fixator în torrentul circulator (fixare intra vitală).

Fragmentele de țesut obținute din puncții sau biopsii, sau fragmentele mici din țesuturile organelor recoltate imediat după sacrificarea animalului de experiență, sînt puse pe fața fără emulsia de azotat de argint a unei hîrtii fotografice.

Peste fragmentul de țesut sau organ se aplică 1 - 2 picături din lichidul fixator (glutaraldehidă tamponată) răcită la 4°C pentru a opri pe cît posibil acțiunea distructivă a enzimelor celulare (printr-o începere cît mai rapidă a fixării).

Din fragmentele recoltate cu ajutorul a două lame noi bine degresate, se confecționează fragmente mici, de formă cubică, cu latura de 1 mm.

Cu ajutorul unei scobitori se ridică fragmentele astfel prelevate și se introduc într-un flacon cu fixator răcit la $+ 4^{\circ}\text{C}$.

5.3. Fixarea

Ca și în cazul fixării pentru examinarea în microscopia fotonică, procesul de fixare în tehnicile de microscopie electronică asigură conservarea structurilor biologice cât mai aproape de starea lor funcțională, vie.

Fixarea se realizează cu ajutorul unor lichide fixatoare care determină formarea unor legături încruciate între moleculele constitutive ale materialului prelucrat, care împiedică deteriorarea arhitectonicii ultrastructurale.

Dintre substanțele cu proprietăți fixatoare amintim: tetraoxidul de osmiu (OsO_4), permanganatul de potasiu, formaldehida, glutaraldehida, etc. Aceste substanțe sînt folosite în amestec cu diverse soluții tampon (acetat veronal, cacodilat, fosfat etc.) cu scopul de a asigura amestecurilor fixatoare un pH neutru și o miliosmolaritate cât mai apropiată de cea a mediului intern al organismului. ($\text{pH} = 7,2 - 7,4$ și 385 mOsm).

În laboratorul nostru de Microscopie Electronică folosim cu foarte bune rezultate, Fixatorul 251 (glutaraldehidă 2,5%) care se obține din :

- + glutaraldehidă distilată 10% 2 părți
- + tampon fosfat 0,1 M 5 părți
- + apă distilată 1 parte.

Glutaraldehida tamponată se păstrează la frigider și poate fi folosită numai două săptămîni de la data preparării.

Toți timpii fixării se fac la temperatura de $+4^{\circ}\text{C}$.

5.3.1. Metode de lucru

+ fragmentele prelevate sînt introduse cu ajutorul unei scobitori într-un recipient în care se află glutaraldehida tamponată, unde vor sta o oră (la frigider);

+ se îndepărtează fixatorul iar piesele se spală de trei ori a cîte o oră cu tampon fosfat 0,15 M;

+ după înlăturarea celui de al treilea tampon fosfat 0,15 M, fragmentele sînt post-fixate timp de o oră în fixator Milloning, acest fixator se obține prin dizolvarea unui gram de tetraoxid de osmiu în 100 ml tampon fosfat 0,15 M. Se poate folosi 1 - 2 săptămîni de la data preparării, ținut la întuneric și la frigider. ($+ 4^{\circ}\text{C}$).

صاف (بضعف)

5.4. D e s h i d r a t a r e a

Tehnicile de deshidratare au scopul de a îndepărta apa din fragmentele fixate. În cazul în care fixarea s-a făcut în condiții bune, deshidratarea nu produce modificări în fragmentele recoltate.

În procesul de deshidratare, apa din piesă este înlocuită treptat prin trecerea acestora prin băi succesive cu alcool sau acetonă în concentrație crescîndă

Alegerea substanței dehidratante este în funcție de materialul de includere, deoarece acesta trebuie să fie miscibil cu agentul de dehidratare: în cazul folosirii vestopalului se folosește acetonă iar în cazul Eponului - alcoolul etilic.

Timpii sînt următorii :

+ acetona sau alcoolul etilic	30 %	2'
+ acetonă sau alcool etilic	50 %	2'
+ acetonă sau alcool etilic	70 %	30'
+ acetonă sau alcool etilic	90 %	30'
+ acetonă sau alcool etilic	100 %	30'
+ acetonă sau alcool etilic	100 %	30'
+ acetonă sau alcool etilic	100 %	30'

Ultimile două băi cu acetonă sau alcool etilic absolut se țin la temperatura camerei.

5.5. Includerea

Metodele de includere folosite în microscopia fotonică se pot folosi și la includerea țesuturilor ce urmează a fi studiate la Microscopul electronic.

Substanțele folosite la includere pentru microscopia electronică trebuie să prezinte următoarele calități:

- + să fie solubile în substanțele de dehidratare
- + să poată pătrunde ușor în fragmentele de țesut sau organ;
- + să fie transparente pentru a permite centrarea piesei și fasonarea blocului în vederea secționării.

+ în urma polimerizării să facă masă compactă cu piesa;

+ să polimerizeze fără modificări de volum care ar modifica forma piesei;

+ să aibă o anumită duritate care să permită o bună secționare; *naft 0,5% ceruri*

Substanțele de includere folosite la noi fac parte din grupul rășinilor poliesterice (Vestopalul) sau a rășinilor epoxidice (Epon 812).

5.5.1. Includerea în Vestopal

Vestopalul polimerizează (se întărește) cu ajutorul unui inițiator sau catalizator (peroxidul de benzoil) și a unui activator (naftenat de cobalt).

Vestopalul de lucru se prepară în timpul deshidratării pieselor și din el se fac, în acetonă absolută, trei concentrații diferite în care piesele sînt ținute cîte o oră.

- | | |
|----------------|----------------------------|
| + Vestopal I | - o parte Vestopal |
| | - 3 părți acetonă absolută |
| + Vestopal II | - 2 părți Vestopal |
| | - 2 părți acetonă absolută |
| + Vestopal III | - 3 părți Vestopal |
| | - 1 parte acetonă absolută |

În Vestopalul de lucru fără acetonă absolută, piesele se țin 12 - 24 ore, sticluta nemaiavînd dop.

Capsulele în care se face includerea propriu zisă și care sînt confecționate din gelatină sau polietilenă sînt ținute în termostaț la 37°C - 60°C pentru

pentru a pierde apa.

În aceste capsule așezate perpendicular pe un suport se introduce o picătură de Vestopal de lucru pe marginea lor, pentru a evita formarea bulelor de aer.

Cu ajutorul unei scobitori în fiecare capsulă se introduce un singur fragment din țesut care se așează central; se introduce eticheta cu numărul cazului și apoi se umple capsula cu Vestopal.

Suportul cu capsule este așezat în termostată la 60°C unde polimerizarea Vestopalului se face în 24 - 48 ore. La sfârșitul polimerizării blocul trebuie să fie transparent, să conțină în vârful său piesa care este de culoare neagră (datorită post-fixării cu tetroxid de osmiu) și să fie suficient de dur.

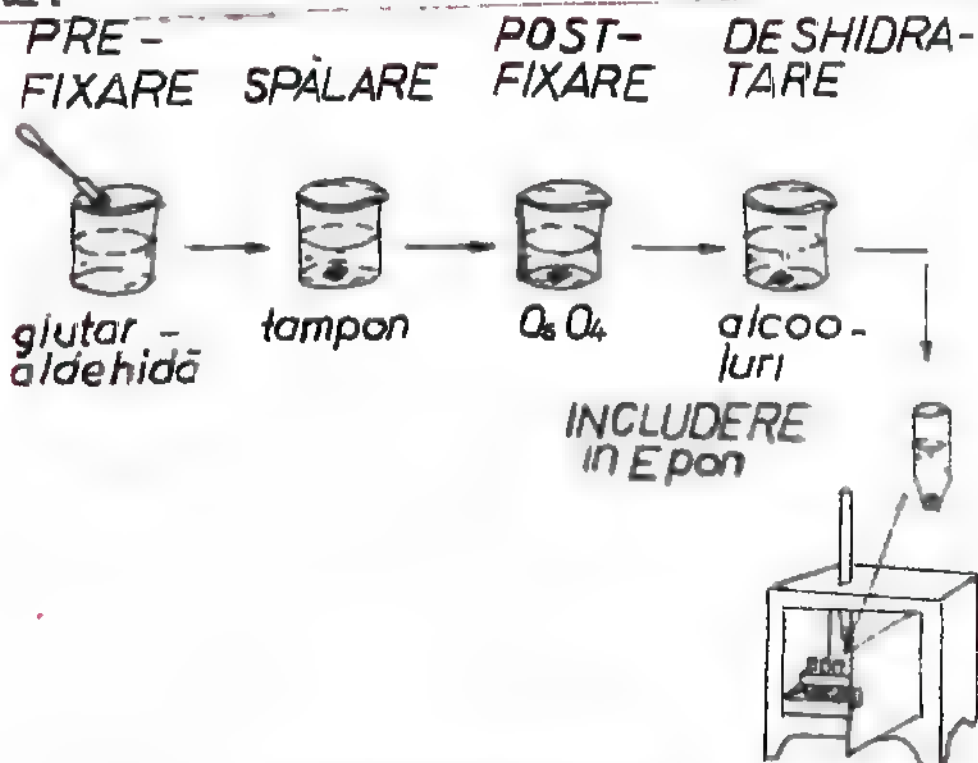


Fig.4. Fixarea și includerea în Epon.

6

METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC IN

MICROSCOPIA ELECTRONICA

Sectionarea și aplicarea secțiunilor pe port-obiect

Contrastarea secțiunilor

6.1. Sectionarea

Pentru a putea fi examinate la microscopul electronic, piesele trebuie secționate cu ajutorul unor aparate de construcție specială, numite ultramicro-
toame.

Există două tipuri de ultramicrotoame:

+ Ultramicrotoame cu expansiune mecanică (Porter-Blum) care au același principiu de funcționare ca și microtoamele de parafină;

+ Ultramicrotoame cu expansiune termică care funcționează pe baza principiului de dilatare termică (L.K.B. Reichert) ; tija metalică care servește drept suport pentru blocul cu piesa de organ ce urmează a fi secționată, are înfășurată pe ea o bobină; la trecerea unui curent electric tija se încălzește, se dilată și transmite dilatarea ei, deplasându-se

către cuțitul care este fix. Concomitent cu mișcarea orizontală, tijei i se imprimă și o mișcare verticală de sus în jos.

6.2. Fasonarea blocului. Pentru ca fragmentul de țesut sau organ să poată fi secționat, trebuie mai întâi îndepărtată capsula de gelatină cu polietilenă aceasta se realizează printr-o tăietură cu lama de-a lungul ei și înlăturarea ei.

Blocul astfel obținut se fixează într-un port-bloc, după care urmează fasonarea lui, adică obținerea unei piramide în al cărei vîrf trebuie să se găsească materialul de secționat.

Fasonarea se face cu ajutorul unei lame de ras și sub lupă binoculară. În timpul confecționării piramidei unghiul de iluminare al blocului trebuie astfel ales încît imaginea prin lupă să permită o cît mai bună vizualizare a suprafeței de secționat.

Prima secțiune este orizontală, îndepărtîndu-se o calotă subțire de vestopal de la vîrfului blocului pînă la piesă. Prin patru tăieturi oblice în jos și în afară se obține piramida a cărui vîrf trunchiat trebuie să aibe forma unui pătrat cu latura de 0,1 - 0,2 mm. O suprafață mică de secțiune permite obținerea unor secțiuni uniforme și subțiri.

6.2.1. Secționarea propriu zisă. se realizează cu ajutorul unor cuțite speciale confecționate din oțel, sticlă, diamant. Cele mai utilizate sînt cuțitele din sticlă specială, cît mai dură.

Pentru confecționarea cuțitelor (în sticlă se folosește un aparat special numit knife - maker. Muchia cuțitului trebuie să fie orizontală și examinată la lupă, trebuie să apară ca o dungă subțire, luminoasă, lipsită de asperități.

Pe vârful utilizabil al cuțitului (care are formă triunghiulară) se confecționează un bazin mic numit în mod curent "bac", folosind bandă de leucoplast sau scotch.

Blocul se umple cu o cantitate suficientă de apă distilată care trebuie să atingă muchia cuțitului.

Unghiul de înclinare a cuțitului față de suprafața blocului trebuie să fie de aproximativ 2-3 grade.

Aceste pregătiri terminate, se pune în funcțiune ultramicrotomul. La fiecare cădere a blocului, pe cuțit trebuie să apară o nouă secțiune ce o împinge pe cea precedentă, astfel încât secțiunile obținute se întind ca o bandă pe suprafața apei distilate din bac.

Examinarea mersului secționării și a benzii de secțiuni obținute se face cu ajutorul unei lupe binoculare montate la ultramicrotom. Iluminarea bachelui și a conținutului său se face cu o sursă de lumină rece (lampă fluorescentă) pentru a evita eventualele dilatări ale blocului sau cuțitului.

Grosimea secțiunilor se poate aprecia după culoarea de interferență pe care o prezintă în momentul secționării : secțiunile ultrafine au o cu-

loare galben - pai și corespund unei grosimi de 250-300 Å.

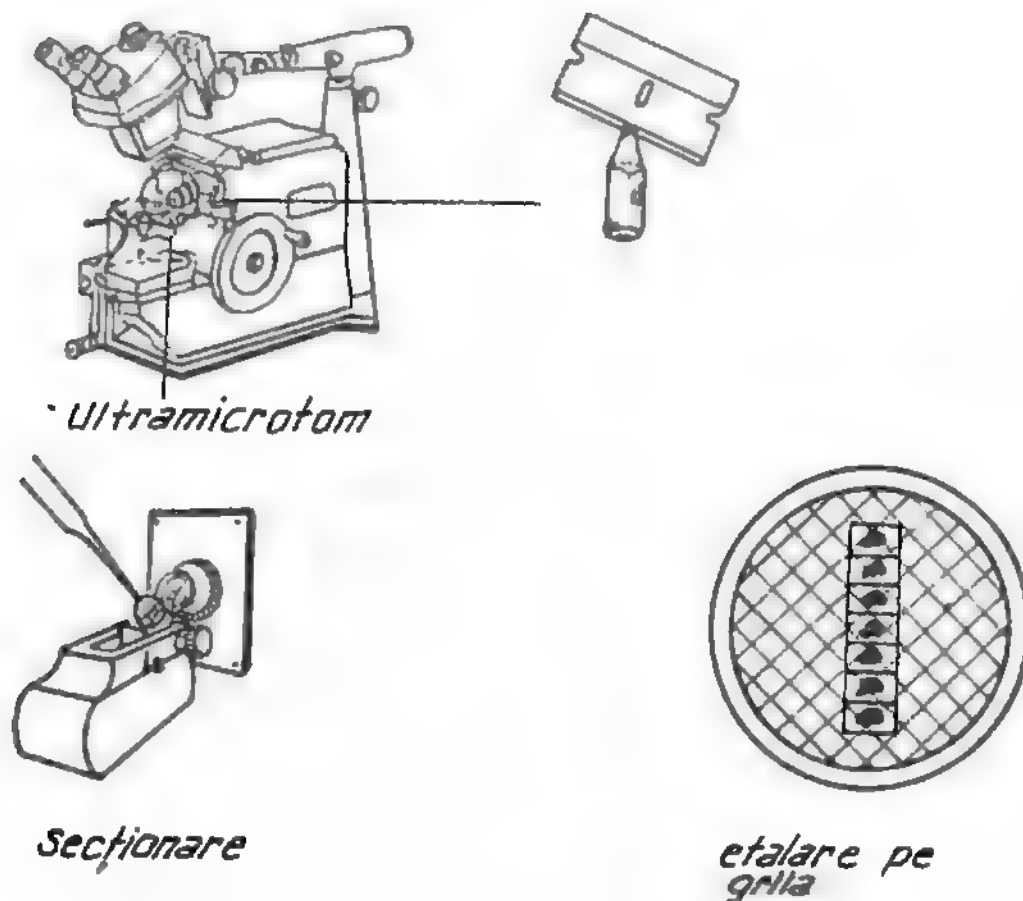


Fig.5. Secționarea și etalarea secțiunilor pe grilă

6.2.2. Secțiunile semifine care se fac tot cu ajutorul ultramicrotomului, folosind însă avansul manual : au o grosime de 1500-3200 Å.

Secțiunile semifine se culeg cu o ansă de sîrmă foarte subțire și se așază pe o lamă foarte curată. Apa adusă odată cu secțiunile este înlăturată prin încălzirea lamei la flacără pînă la evaporarea ei; căldura mărește aderența secțiunilor pe lamă.

Locul rămas după evaporarea apei (unde se găsesc secțiunile semifine) se acoperă cu câteva picături dintr-o soluție de albastru de toluidină 1 %. Lamelle cu colorantul pe ele se pun în termostată la 60°C unde se lasă 10-30 minute, după care se spală la un jet mic de apă curgătoare. Se sugativează și se examinează la microscopul fotonic.

Cu ajutorul secțiunilor semifine care se fac înainte celor ultrafine se localizează zona care interesează și se verifică dacă blocul respectiv conține elementele pe care ni le-am propus să le examinăm.

6.3. Aplicarea secțiunilor pe port-obiect

Spre deosebire de microscopia fotonică, în microscopia electronică se folosește un port-obiect pentru secțiuni foarte fine alcătuit din două componente:

- + o grilă metalică și
- + o peliculă de natură organică care acoperă suprafața grilei.

6.3.1. În prezent se folosesc grile confecționate pe cale electrolitică: din cupru, nichel, argint, aur, platină, tungsten, cu diametrul de 2,3 - 3 mm. Ochiurile acestei grile au formă pătrată.

Criteriul de indentificare a grilelor este "mesh"-ul (exemplu : 75 - 400 mesh) ; mesh-ul reprezintă numărul de ochiuri pe un "inch" , adică

2,54 cm. Grilele de 75, 100 și 150 mesh se utilizează foarte rar deoarece au ochiuri foarte mari și pelicula cu care sînt acoperite nu rezistă la fluxul de electroni. Grilele de 300 - 400 mesh se pot utiliza fără peliculă.

6.3.2. Grilele cu 75 - 200 mesh, pentru a constitui suportul ideal pentru preparat, trebuie să fie acoperite cu o peliculă foarte fină (pînă la 200 Å grosime), transparentă și rezistentă la fluxul de electroni.

Pelicula se obține dintr-o serie de substanțe dizolvate în solvenți organici. Pentru confecționarea lor noi folosim parlodionul 1% în acetat de amil.

Tehnica pentru obținerea peliculelor este următoarea: un cristalizator o sticlă curată, cu diametrul de 20 cm și înălțimea de 8 cm se umple cu apă distilată proaspătă; cu ajutorul unei micropipete se lasă să cadă pe suprafața apei de la o mică distanță o picătură din soluția de parlodion 1%. Picătura se întinde instantaneu pe suprafața apei și după cîteva minute, cînd solventul a fost eliminat prin evaporare și difuzare în apă, membrana capătă o rezistență suficientă pentru a putea fi utilizată.

Cu o pensă foarte fină se așează grilele pe peliculă, în rînduri paralele după care sînt culese cu ajutorul unei g hîrtii poroase (hîrtie de ziar); grilele astfel obținute se pun într-o cutie Petri acoperită cu o hîrtie de filtru pentru a le feri de praf.

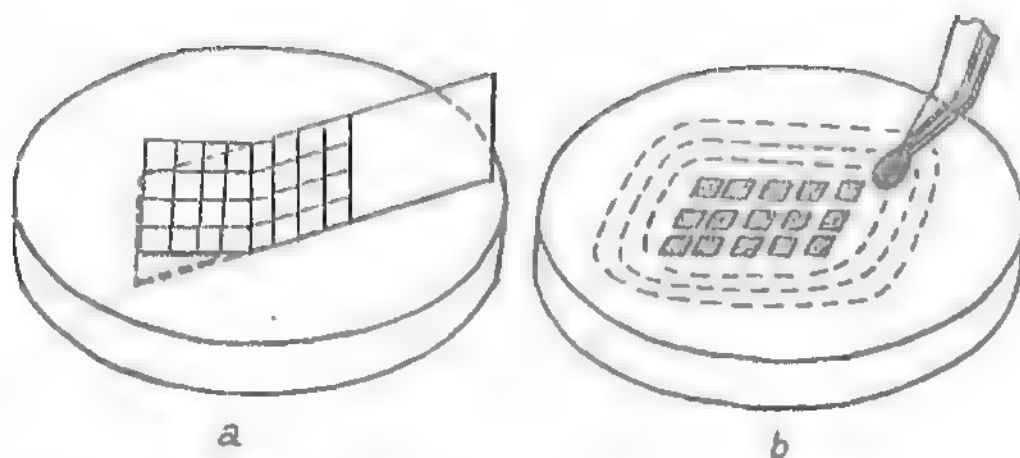


Fig. 6. Formarea peliculei și depunerea ei pe grile.

Grilele pot fi utilizate imediat după uscare, adică după 24 de ore. Pentru a mări rezistența mecanică a peliculelor la fluxul de electroni, pe suprafața lor se depune un strat subțire și uniform de carbon. Acest lucru se realizează cu ajutorul aparatelor de metalizare, prin vaporizarea carbonului cu ajutorul unui arc voltaic realizat între doi electrozi de carbon. Evaporarea trebuie să aibă loc la un vid înaintat de $10^{-5} - 10^{-6}$ Torr.

6.3.3. Secțiunile ultrafine se culeg de pe suprafața apei din bac prin aplicarea deasupra lor, cu ajutorul unei pense fine a feței grilei acoperită cu peliculă. Prin îndepărtarea apei cu ajutorul hîrtiei de filtru, secțiunile aderă puternic la peliculă. Grile cu preparatul în sus se plasează într-o cutie Petri, pe fundul căreia se află hîrtie de filtru;

pe aceasta se scrie numărul blocului.

Se acoperă Petri-ul cu capac și se lasă grilele să se usuce după care se poate face contrastarea secțiunilor.

6.4. Contrastarea.

Pentru a mări contrastul secțiunilor de țesuturi și organe se face colorarea lor pozitivă. Ea se realizează cu compuși ai unor metale grele (oxizi, hidroxizi, acizi, săruri).

În Laboratorul de Microscopie Electronică se practică o dublă contrastare, cu acetat de uranil și cu citrat de plumb.

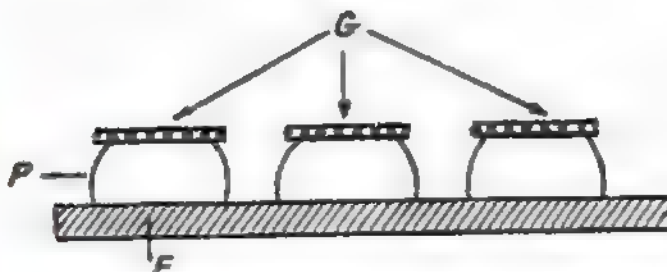


Fig.7 - Contrastarea secțiunilor.

6.4.1. Contrastarea cu acetat de uranil.

Cu o pipetă se umplu godeurile făcute pe o placă de plexiglas cu o soluție de acetat de uranil 13 %.

Fața grilelor pe care sînt secțiunile se aplică pe suprafața picăturilor din godeuri pentru 10 minute și la întuneric. Se spală apoi grilele trecîndu-se prin trei băi cu alcool 50% . Lichidul de pe grilă se sugativează cu hîrtie de filtru.

6.4.2. Contrastarea cu citrat de plumb. (soluția Reynolds) se face imediat după prima.

Pe o placă de parafină se pun atîtea picături de soluție Reynolds cîte preparate sînt de colorat. Peste aceste picături se pun grilele cu preparatul în jos și se țin 3 minute după care se spală cu apă bidistilată.

Se îndepărtează apa cu o hîrtie de filtru după care preparatele se pot examina la Microscopul electronic.

7. METODE CURENTE DE CITOCIMIE

7.1. I n t r o d u c e r e

Prin citochimie se înțelege identificarea și localizarea pe preparate histologice a unor constituenți chimici celulari.

Aplicarea tehnicilor de citochimie face posibilă localizarea cât mai exactă la nivel celular sau tisular a substanțelor cercetate, realizându-se concomitent o analiză chimică și una morfologică (topochimie).

Metodele citochimice trebuie să îndeplinească două condiții esențiale :

- + să facă posibilă identificarea specifică și constantă a substanței, chiar dacă aceasta se află în cantități foarte mici;

- + localizarea topografică precisă a substanței cercetate.

7.2. R e c o l t a r e a p i e s e l o r

Se face în aceleași condiții ca cele expuse în capitolul 1.2. *pag 5*

7.3. F i x a r e a

In citochimie, fixarea se realizează prin:

7.3.1. Agenți fizici adică criofixare, crio-

deshidratare și criosubstituție.

În fixarea prin agenți fizici, factorul esențial îl reprezintă congelarea cât mai rapidă a pieselor la temperatură cât mai scăzută.

Avantajele fixării prin agenți fizici sînt următoarele :

+ oprește orice activitate enzimatică, împiedicînd astfel autoliza celulară post-mortem.

+ conservarea structurilor celulare echivalează cu cele mai bune fixări chimice pentru citologie.

+ deplasarea substanțelor solubile sau difuzibile este mai redusă decît în orice alt procedeu de fixare.

7.3.2. Fixarea prin agenți chimici trebuie să îndeplinească următoarele condiții:

- + să nu deplaseze dintr-un sector în altul substanțele de cercetat;
- + să nu le dizolve;
- + să nu le modifice structura chimică
- + să permită desfășurarea normală a reacțiilor chimice care urmează să fie aplicate.

Trebuie subliniat faptul că nu există un agent fixator chimic pentru conservarea tuturor substanțelor evidențiable prin reacții citochimice.

Un fixator dat poate conserva într-o măsură mai mare sau mai mică anumite substanțe dar concomitent, prin solubilizare el poate îndepărta parțial sau total alte substanțe.

7.3.3. Durata fixării este mult mai strictă în citochimie și citoenzimologie deoarece ea este dictată de eventuala acțiune extractivă a fixatorului asupra unor componente chimici.

7.3.4. Volumul fixatorului va fi suficient de mare pentru a împiedica diluarea lui cu apa din piese; el va fi schimbat de 1-2 ori în decursul fixării.

7.3.5. Temperatura fixatorului influențează atât procesele de autoliză celulară cât și viteza de pătrundere în piesă. Se preferă fixarea la rece ($0^{\circ}\text{C} - +4^{\circ}\text{C}$) care previne autoliza dar mărește durata fixării.

7.3.6. p.H-ul fixatorilor va trebui să fie cât mai apropiat de valorile fiziologice (p.H = 7,2-7,4)

7.4. I n c l u d e r e a

Efectul tuturor factorilor implicați în procesul de includere (solvenți organici, temperatură, durată, etc) asupra diferiților constituenți chimici celulari trebuie bine cunoscut deoarece, ceea ce s-a păstrat corect prin fixare, se poate pierde la includere.

Cele mai multe din metodele de citochimie și citoenzimologie se realizează prin tehnica criotomieii iar cele care folosesc fixatori chimici se realizează prin includere la parafină.

7.5. Sectionare

Pentru piesele incluse la parafină, secționarea se face în modul cunoscut din tehnica descrisă la capitolul 1.6.

Pentru fragmentele fixate prin agenți fizici se utilizează secționarea descrisă la capitolul 1,6 și 4.5.

7.6. Lipirea secțiunilor

Se face cu diverse soluții : de albumină, glicerină, albumină-glicerină (Mayer), amidon, gelatină, etc.

Soluția pentru lipirea secțiunilor pe lame port obiect trebuie aleasă în funcție de reacția citochimică ce urmează să se facă. De exemplu în reacțiile pentru glicogen, etc, lipirea cu aceste substanțe este contraindicată; în aceste situații, lipirea se face prin procedeul uscat.

7.7. Reacțiile pentru evidențierea substanțelor.

Au drept scop final furnizarea la examenul microscopic al preparatului, a unui semnal care, să ne informeze corect asupra prezenței unei sau unui grup de substanțe.

Din numărul mare al reacțiilor citochimice numai unele pot fi echivalente cu reacțiile de microchimie analitică.

În marea lor majoritate aceste reacții evidențiază doar grupe de substanțe și mai ales radicali

sau funcții chimice. Există reacții citochimice care evidențiază doar o anumită proprietate chimică legată de anumiți radicali sau funcții chimice ca de exemplu proprietatea reducătoare, oxidantă, bazofilă, meta-cromazia, etc.

În lucrările curente de citochimie, aprecierea rezultatelor se face de obicei numai sub aspect calitativ, adică substanța cercetată este prezentă sau absentă, completându-se cu observații de ordin cantitativ, adică precizând că substanțele respective se află în cantitate foarte redusă (F), moderată (+), mare (++) , foarte mare (+++) sau absentă (-).

7.7.1. Evidențierea histochimică a unor substanțe minerale.

Se efectuează datorită importanței lor în citofiziologie, morfopatologie, toxicologie, medicină legală, etc.

De exemplu fierul, element cu o deosebită importanță fiziologică, prezintă un interes major atât pentru citologi cât și pentru morfopatologi. În țesuturile animale fierul se află sub două forme:

+ fierul ionic (Fe^{+++}) ușor de pus în evidență prin metode foarte specifice și sensibile;

+ fierul mascat, evidențiable prin metode chimice dar după folosirea unui procedeu de demascare.

Se recomandă fixarea în formol neutru 10% sau Bouin și includerea la parafină.

Tehnica de evidențiere a fierului ionic se bazează pe următorul principiu : în mediul acid, ioni ferici (Fe^{+++}) reacționează cu ferocianura de potasiu formând un precipitat albastru de ferocianură ferică sau albastru de Prusia. (De examinat la microscop cu obiectivul la secțiuni prin pulmon hemoragic colorat cu metoda albastrului de Prusia (Perls). Se observă granule de culoare albastră (Fe^{+++}) , iar nucleii de culoare roșie.

7.7.2. Evidențierea histochimică a glucidelor.

Glucidele sînt aldehide-cetone a unor alcooli polihidroxilici și joacă un rol deosebit în activitatea celulară. Ele pot fi substanțe energetice de prim ordin (exemplu; glicogenul), iar prin combinarea lor cu proteinele formează glicoproteinele ce la rîndul lor intră în alcătuirea glicocalixului. Ele pot fi evidențiate prin următoarele metode:

1. Studiul metacromaziei. Colorarea selectivă a anumitor structuri celulare sau tisulare în alte nuanțe decît cea a soluției colorante se numește reacție sau colorație metacromatică.

Valoarea ei formativă a metacromaziei este mai mare decît cea a bazofiliei deoarece ea indică pe lîngă prezența grupărilor acide dintr-o substanță dată, densitatea și chiar natura acestora.

Substanțele care răspund la reacția metacromatică fac parte din următoarele trei grupe : mucopolizaharide, acizi nucleici și lipide cu caracter acid.

Cei mai folosiți coloranți metacromatici sînt cei

tiazimici iar dintre aceștia, în special albastrul de toluidină, albastrul de crezyl, azur A, etc.

Pentru studiul metacromaziei se pot folosi și secțiunile semifine făcute din preparatele pentru microscopie electronică.

În mod curent se folosește albastrul de toluidină 0,1 - 0,25 % în apă distilată și 1% pentru secțiunile semifine.

Preparat. - Pe secțiunile semifine, structurile metacromatice sînt colorate în roșu-violaceu.

2. Evidențierea glicogenului a mucopolizaharidelor neutre, a glicoproteinelor și a glicolipidelor se face cu ajutorul reacției P.A.S. (reacția acid periodic- Schiff).

Preparat - Pe secțiunile de rinichi embrionar, substanțele P.A.S. pozitive se colorează în roșu violaceu.

7.7.3. Evidențierea histochimică a lipidelor.

Lipidele, cu rol important în metabolism, pot fi și ele evidențiate cu ajutorul reacțiilor histochemice.

Ca și în cazul glucidelor în evidențierea histochimică a lipidelor se apelează la reacții sau colorații generale, reacții pentru anumiți radicali (carbonil, sterol), reacții pentru evidențierea caracterului acid, nesaturat, etc., reacții pentru componenta glucidică, protidică.

Colorațiile generale pentru evidențierea lipidelor totale se fac cu ajutorul lizocromilor (Sudan, Scharlach, Oil Red, etc.); aceste substanțe dau puține indicații referitoare la constituția chimică a lipidelor, evidențierea lor fiind bazată doar pe dizolvarea lizocromilor în acele lipide care la temperatura laboratorului rămân în stare lichidă.

Pentru colorarea generală a lipidelor totale se folosește formolul neutru 10% .

Deoarece lipidele sînt solubile în solvenți organici ca xilolul , toluolul, benzenul, includerea nu se poate face la parafină; colorarea se va aplica pe secțiunile făcute la microtomul de gheață.

Preparat. Secțiunile de ficat colorate cu Sudan III sau IV , prezintă lipidele totale colorate în roșu.

7.7.4. Evidențierea histochimică a proteinelor.

Proteinele constituie partea cea mai importantă de substanțe organice din celule. Ele se clasifică în:

- + aminoacizi (substanțe cu caracter amfoter)
- + peptidele (combinația dintre doi sau mai mulți aminoacizi).
- + holoproteine sau proteine (sînt formate numai din aminoacizi).
- + heteroproteine (conțin în afară de aminoacizi și alte substanțe ca de exemplu glucide și lipide).

Metodele bazate pe reacții histochimice se

grupează în :

- + reacții generale pentru proteine totale;
- + reacții de grup care evidențiază un anumit număr de grupări reactive;
- + reacții pentru grupări speciale (tirozină, triptofan, arginină, etc);
- + reacții de identificare prin blocaj specific.

Acizii nucleici sau nucleoproteinele cu o mare importanță biologică, se pot evidenția pe secțiuni histologice.

Metodele de evidențiere pot demonstra prezența diferitelor componente ale acestora; bazele purinice, pirimidinice, riboza și dezoxiriboza, acidul fosforic și fracțiunea proteică (proteine histone și nehistone)

Rezultatul reacțiilor depinde în mare măsură de pretratamentul pieselor și în special de fixare. Fixatorii indicați sînt cei precipitanți, în special alcoolul, amestecurile pe bază de alcool și acid acetic (fixatorul Carnoy). Acesta fiind un amestec acid, realizează prin precipitarea nucleoproteinelor o bună fixare morfologică.

Pentru evidențierea acizilor nucleici se folosește metoda lui Brachet care utilizează doi coloranți bazici: verdele de metil și pironina.

Preparat. Pe secțiunile colorate cu metoda lui Brachet, A.D.N.-ul se colorează în verde (colorație nespecifică - colorația specifică a A.D.N.-ului se face cu metoda Feulgen, el căpătînd o culoare roz - roșu), iar A.R.N.-ul în roșu.

8. METODE CURENTE DE CITOENZIMOLOGIE

8.1. I n t r o d u c e r e

Enzimele sînt compuși chimici care catalizează reacțiile de sinteză și degradare din substanța vie. Ele sînt așadar biocatalizatori care joacă un rol fundamental în reglarea proceselor metabolice ; intervin deasemeni în toate procesele de creștere și regenerare tisulară.

În celulă, enzimele se găsesc fie absorbite pe anumite structuri, fie dispersate omogen în citoplasmă.

Evidențierea prezenței enzimelor se face prin metode biochimice (vezi 8.3.) iar decelarea unei activități enzimatică se face prin metode histotopochimice. Cu alte cuvinte, prin metodele de histoenzimologie se pune în evidență "o activitate enzimatică" și nu enzima ca atare.

Metodele histoenzimologice pun în evidență existența produsului de reacție, rezultat al acțiunii unei enzime asupra unui substrat. Cazul ideal din punct de vedere histoenzimologic este ca produsul de reacție să fie insolubil (pentru a nu difuza din locul în care s-a produs reacția) și colorat pentru a putea fi observată în microscopie prezența lui.

8.2. Metode citoenzimologice

Principalele etape ale obținerii preparatului pentru reacții enzimatică sînt, în parte asemănătoare cu cele din citologia clasică (recoltare, fixare, secționare, montare) dar prezintă două etape caracteristice : incubarea și vizualizarea.

8.2.1. Recoltarea. Spre deosebire de citologia clasică, reacțiile histoenzimologice se pot face numai pe fragmente de țesuturi sau organe recoltate " in vivo" (prin biopsie sau la foarte scurt timp după sacrificarea animalului).

8.2.2. Fixarea. In mod obişnuit se folosesc secțiunile făcute la criotom. In cazul în care se folosesc lichide fixatoare, fixarea se face la rece ($0^{\circ} - + 4^{\circ}\text{C}$) timp de maximum 18 - 24 ore (prelungirea duratei de fixare produce artefacte prin difuziunea enzimelor).

8.2.3. Incubarea, reprezintă cea mai importantă etapă din tehnica histoenzimologică.

Scopul principal al incubării este de a oferi enzime a cărei activitate urmează să fie evidențiată, un substrat îmbogățit artificial prin adăugarea la mediul de incubare a substratului adecvat enzimei respective. Acest lucru se face cu scopul de a mări viteza de reacție în sensul formării produsului " enzimă + substrat" , chiar dacă enzima se află în cantități foarte mici. Cuplul enzimă + substrat reprezintă de fapt activitatea enzimatică.

Un alt scop al incubării este acela de a face insolubil produsul de reacție (enzimă + substrat).

Enzimele prezintă două fracțiuni:

- + o fracțiune hidrosolubilă numită lioenzimă;
- + o fracțiune liposolubilă numită desmoenzimă.

Lioenzymele se pierd în timpul diferitelor manopere de obținere a preparatului histoenzimatic, evidențiindu-se numai desmoenzyme.

Dacă produsul de reacție (enzimă + substrat) este solubil așa cum se întâmplă în cazul hidrolazelor atunci el trebuie transformat într-un produs insolubil printr-un procedeu numit "captură". De exemplu dacă produsul de reacție este un anion (fosfat, carbonat), el devine insolubil prin captura de ioni metalici (plumb).

Pentru realizarea acestor scopuri, mediul de incubare trebuie să conțină :

+ substratul specific (natural sau sintetic) al enzimei a cărei activitate urmează a fi pusă în evidență (exemplu de substrat sînt sărurile de tetrazolin, folosite pentru decelarea activității oxidoreductazei);

+ substanța care asigură insolubilizarea produsului de reacție (exemplu : în cazul fosfatazelor, prin hidroliză enzimatică se eliberează anionul fosfat care este precipitat prin "captura" de cationi de Ca^{++} pentru fosfataza aloalină și plumb (Pb^{++}) pentru fosfataza acidă; acești "cationi de captură" se adaugă mediului de incubare sub formă de clorură de calciu și respectiv azotat de plumb);

+ substanța care asigură în timpul incubăției vizualizarea activității enzimaticice (exemplu sulfura de amoniu va forma în cazul fosfatazei acide sulfură de plumb, substanță cromoforă de culoare brun închis); ea poate fi vizualizată microscopic și indică histotopochimic activitatea enzimatică a fosfatazei acide.

Se acordă o atenție deosebită pH-ului mediului de incubare deoarece activitatea fiecărei enzime se desfășoară la un anumit pH optim de acțiune.

O importanță deosebită o are timpul de incubare. S-a constatat că saturarea enzimei cu substrat se face în 20 minute; se recomandă totuși tatonarea timpului optim de incubare.

8.2.3. Vizualizarea. Prin vizualizarea activității enzimaticice se înțelege observarea la microscop a unei anumite culori, cu aspect granular sau difuz.

Aceasta indică în principiu locul activității enzimaticice (aspectul histotopochimic al vizualizării și prezintă o anumită intensitate tinctorială care demonstrează intensitatea activității enzimaticice (aspectul de histoenzimologie cantitativă a vizualizării)).

Pentru a fi siguri de specificitatea reacțiilor este necesară efectuarea unor preparate de control. Preparatele de control sînt acelea în care, prin diferite procedee, se include sau se inhibă activitatea enzimatică.

În momentul de față există metode pentru evidențierea activității următoarelor grupe de enzime:

I. Enzimele din grupul oxidoreductazelor fac parte din grupa mare a enzimelor care catalizează procesele de oxidare și reducere din celula vie. Reacțiile de oxidoreducere sînt printre cele mai importante procese ale transformărilor biochimice deoarece ele produc cea mai mare parte de energie liberă de care are nevoie celula pentru realizarea activității sale fiziologice normale.

Prin acțiunea catalitică a acestor enzime, celula degradează pe cale oxidoreductoare componentele nutritive ajunse la ea. Energia potențială a acestor componente eliberată în urma reacțiilor de oxido-reducere este depozitată în compuși macroergici și folosită ulterior pentru realizarea travaliului celular.

De exemplu activitatea succindehidrogenazei se poate pune în evidență prin metoda NACHLAS-SELIGMAN. Principiul este următorul: succindehidrogenaza eliberează hidrogenul din sărurile acidului succinic pe care le transformă în fumarat : hidrogenul eliberat este acceptat de o sare de tetrazolin care se reduce în formazan insolubil și colorat.

II. Hidrolazele sînt enzime care catalizează reacțiile de scindare a moleculelor cu fixarea componentelor apei la produsele de scindare. De exemplu desfacerea proteinelor în aminoacizi, a polizaharidelor în monozaharide, a lipidelor în acizi grași și glicerină, sînt toate reacții hidrolitice.

Din grupul hidrolazelor face parte și fosfataza alcalină, activitatea ei se pune în evidență prin metoda

GOMORI-TAKAMATSU principiul este următorul : enzima descompune beta-glicerofosfatul de sodiu în glicerină și acid fosforic. Acidul fosforic intră în reacție cu clorura de calciu în urma căreia se formează fosfatul de calciu insolubil care apoi este transformat în fosfat de cobalt cu ajutorul unei soluții de clorură de azotat de cobalt; prin prelucrarea secțiunilor cu sulfura de amoniu, fosfatul de cobalt se transformă în sulfura de cobalt de culoare neagră sau negru - brună.

Fosfataza alcalină se găsește atât în mediu cât și în citoplasmă; activitatea fosfatazei alcaline este foarte intensă în țesuturile cu multiplicări active ca; foliculi limfatici, măduva osoasă hematopoietică, etc.

III. Transferazele sînt enzime care transferă resturi de molecule de pe un donator pe un acceptor. Exemple de enzime din acest grup sînt: aminotransferazele (transaminaze) care catalizează transferul unei grupări amino de pe un cetoacid (acidul piruvic), glicoziltransferazele care transferă un rest glucidic de pe un donator pe un acceptor.

8.3. Metode biochimice

Cercetări la nivel molecular se fac și prin investigarea biochimică a enzimelor. Aceste cercetări de biologie moleculară a furnizat biologiei și medicinei posibilitatea de interpretare a mecanismelor fundamentale la nivel molecular a unor procese care se petrec la nivel celular, (reglare, corelația dintre sinteză și descompunere, utilizarea energiei, reacții de biosinteză).

8.3.1. Principiul de lucru.

După recoltare, omogenizare și centrifugare activitatea unei enzime poate fi măsurată prin determinarea transformării substratului pe unitate de timp. Determinarea se realizează prin :

- + măsurarea scăderii concentrației substratului
- + prin măsurarea creșterii concentrației produsului de reacție apărut.

Ca bază la măsurarea activității enzimatice este proporționalitatea dintre viteza de reacție și concentrația enzimei.

Exprimarea activității enzimatice se face în unități internaționale. O unitate internațională se definește ca micromoli (substrat transformat / minut / 100 ml (mg)).

În mod obișnuit determinările enzimatice se fac în condiții optime de temperatură, pH, concentrația substratului, coenzime și ioni anorganici.

Măsurarea cantității de substrat netransformat sau a produsului de reacție catalizată se face cu metode spectrofotometrice, colorimetrice, etc.

Determinarea spectrofotometrică este una din cele mai exacte și comode metode de determinare a activității enzimatice. Testul se bazează pe măsurarea scăderii sau creșterii densității optice datorită oxidării NADH sau NADPH și reducerii NAD și NADP. Citirile se fac la 340 nanometri unde formele reduse NADH și NADPH au maximum de absorbție.

8.3.2. Determinarea gama glutamil transpeptidaza (gama GT)

Principiu. Gama G.T. catalizează transferul acidului glutamic de pe un donator - gama p-nitroanilidă - pe un acceptor - glicin - glicina. În urma reacției se formează p-nitroanilina colorată în galben.

Reactivi.

1. substrat sub formă de comprimate = 12,5 mg.

2. tampon Tris HCl - 0,2 M ; p.H. = 8,2

0,605 gr Tris ! _____ 25 ml apă bidistilată

1,7 gr HCl _____ 100 ml apă bidistilată

12,5 ml Tris; 0,2 M + 5,6 ml HCl; 0,2 M _____ 50 ml apă

Mod de lucru.

Se încălzesc 9 ml tampon Tris HCl, pH = 8,2 la 40 - 50°C. Se adaugă substratul care trebuie să se dizolve în cel puțin un minut.

Testul de reacție.

În cuva de citire a fotometrului SPEKOL se pipetează :

+ 1,5 ml soluția substrat în Tris HCl ;

+ se citește T_0 ;

+ se adaugă 0,1 ml proba de analizat și se pornește cronometrul ;

+ se amestecă ;

+ se citesc din minut în minut timp de 5 minute:

71

T_1, T_2, T_3, T_4 și T_5 :

+ citirea se face la 405 nanometrii față de apă.

Calcul.

Se calculează valoarea medie a delta E / minut.

$$\frac{T_5 - T_0}{5} = \text{delta E / minut} .$$

Delta E / minut / 1616 = gama G.T. U/L.

Valori normale

6 - 28 U/L la bărbați ;

4 - 18 U/L la femei .

9. CULTURI DE CELULE

9.1. I n t r o d u c e r e

Cultura de celule este o metodă larg utilizată , aducînd o importantă contribuție în biologie atît din punct de vedere practic cît și teoretic.

Prin cultură de celule se obține o multiplicare "in vitro" a celulelor provenite dintr-un fragment de țesut.

Această metodă permite:

- I. - Studiul caracterelor morfologice și proprietățile biologice ale celulelor din diferite țesuturi, separate de organism și sustrate influenței sistemului nervos și a curentului sanghin. El se realizează prin :
- + examinarea celulelor în stare vie și în condiții normale cu ajutorul microscopului cu contrast de fază;
 - + examinarea celulelor în stare vie dar supuse unui experiment (comportarea lor după acțiunea unor factori fizici sau chimici) în microscopia cu contrast de fază;
 - + examinarea celulelor din culturi, fixate și colorate, cu ajutorul microscopului optic obișnuit.

II. - Studiul unor probleme de biologie tisulară ca de exemplu afinitatea sau antagonismul dintre suse tisulare diferite (paturile celulare ectoblastice și entoblastice nu se alătură fără interpoziție de mezoderm).

(III. - Culturile celulare oferă un excelent substrat pentru cultivarea pe scară largă a unei mari cantități de virusuri, dând astfel posibilitatea obținerii de antigene necesare preparării de vaccinuri.

9.2. Condiții materiale de lucru

Culturile de celule se prepară într-un spațiu amenajat special, care trebuie să ofere condiții optime de sterilitate. Aceste spații vor fi prevăzute cu instalații de apă curentă, gaze, electricitate.

Laboratorul de culturi celulare trebuie să fie dotat cu :

+ + aparatură (pentru sterilizare, distilat și bidistilat apă, agitator magnetic, balanța analitică, termostat de $37^{\circ} - 39^{\circ}\text{C}$, p.H- metru, microscop, etc);

+ + instrumente fine (pense, foarfeci, bisturii);

+ sticlăria trebuie să fie neutră, perfect transparentă, fără neregularități; ea se împarte în recipiente speciale în care se fac culturile, precum și sticlăria obișnuită de laborator).

+ substanțe chimice cu utilități diverse (de exemplu substanțe pentru prepararea mediilor de cultură.

Reușita culturii celulelor "in vitro" depinde în mare măsură de pregătirea sticlăriei, spălarea și sterilizarea ei precum și de pregătirea instrumentarului care trebuie foarte corect făcută.

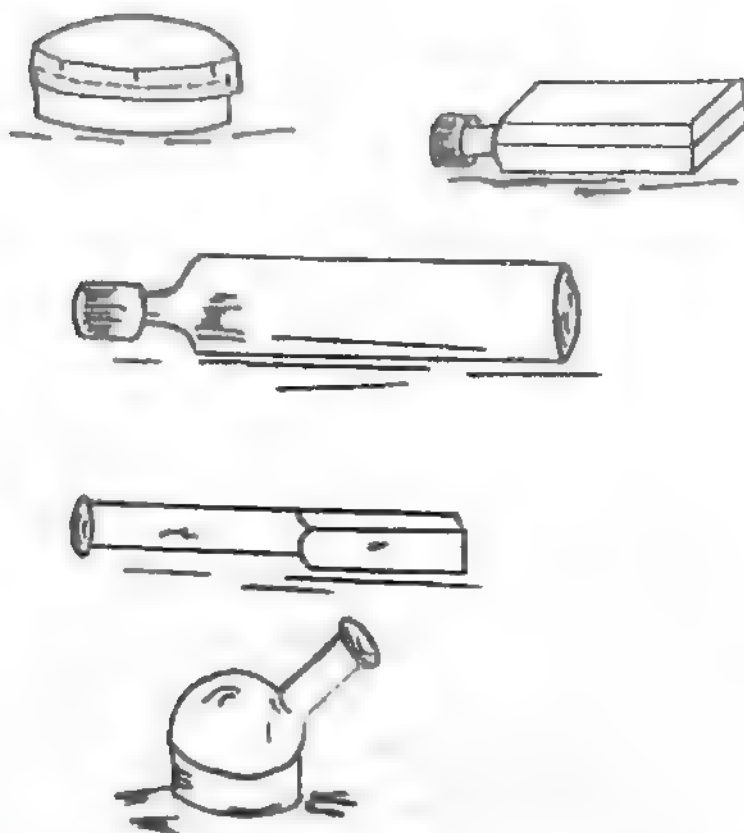


Fig. 8. - Diverse tipuri de vase de cultură

9.3. Mediile de cultură.

Oricare ar fi mediul folosit, el trebuie să asigure celulelor cultivate "in vitro" condiții apropiate de acelea pe care le oferă organismul viu. Deosebirile esențiale dintre aceste două modalități de viață și de multiplicare celulară sînt:

+ "in vivo", celulele sînt supuse controlului neuroendocrin și influenței țesuturilor și organelor din vecinătate; "in vitro" celulele scapă de acest control;

+ "in vivo", aportul de substanțe nutritive ca și eliminarea produselor de metabolism se face în mod continuu prin intermediul circulației sanghine și limfatice; " in vitro " ,aportul și eliminarea sînt periodice.

Mediile de cultură celulară trebuie să asigure :

+ echilibrul ionic obținut cu ajutorul soluțiilor izotone;

+ factorii nutritivi : aminoacizi esențiali, proteine animale (lichide biologice ca plasmă, ser sanghin, lichid amniotic, etc), glucide, vitamine, derivați de acizi nucleici;

+ un pH optim , constant în timp mai îndelungat, obținut cu ajutorul unor substanțe lipsite de citotoxicitate;

+ evitarea contaminării cu germeni patogeni prin adăugarea de antibiotice (penicilină, streptomycină) și antifungice (micostatin, stamicin).

+ stimularea multiplicării și creșterii celulelor prin adăugarea de extracte embrionare.

Mediile de cultură se clasifică după următoarele criterii:

1. după consistență - lichide
- semisolide
2. după compoziție - naturale
- semisintetice
- sintetice

3. după scopul urmărit
- de creștere (extrac-
te embrionare)
 - de întreținere

9.4. Clasificarea culturilor

Se cunosc două mari grupe de culturi:

A. Cultura de organ sau organocultura, înseamnă scoaterea din organism a unui segment de organ (fragment de intestin, trahee) sau organ (rinichi) și introducerea sau perfuzarea lor cu un mediu nutritiv: ele se mențin "in vitro" un timp limitat (transplant).

B. Cultura de celule prin care se obține o multiplicare celulară "in vitro"; există două tipuri de astfel de culturi:

a/ cultura de țesuturi obținută din fragmente de țesut puse în condiții de mediu corespunzătoare: ea are proprietatea de a forma în jurul fragmentului care se numește explant, o coroană de celule fine, în multiplicare, celule care pot fi de tip conjunctiv (fibroblastic) sau de tip epitelial.

b/ cultura celulară propriuzisă obținută prin cultivarea într-un mediu nutritiv a unei suspensii de celule provenite din dilacerarea unui țesut realizată prin tratamentul enzimatic sau chimic.

După criterii tehnologice, culturile celulare se clasifică în :

+ cultura în monostrat în care celulele sînt capabile de multiplicare pe un suport solid, neted;

(+) culturi în suspensii realizate într-un mediu de cultură corespunzător.

9.5. T e h n i c a c u l t u r i i c e l u l a r e

Toate etapele tehnicii culturii celulare trebuie să respecte cu rigurozitate regulile de asepsie.

9.5.1. Recoltarea se poate face din cele mai variate țesuturi provenite de la om, animal sau plante.

După proveniența lor, țesuturile care urmează anfi cultivate se împart în :

a/ țesuturi normale - embrionare
- adulte

b/ țesuturi tumorale -

Recoltarea trebuie să îndeplinească următoarele condiții :

+ să evite contaminarea țesutului cu microorganisme;

+ să evite traumatizarea ei atât în timpul recoltării cât și în cursul manevrelor ulterioare;

+ de la recoltare și pînă în momentul preparării culturii, țesutul va fi păstrat la rece (la $+ 4^{\circ}\text{C}$) într-o soluție salină în care am adăugat antibiotice; timpul scurs de la recoltare și pînă la efectuarea culturii nu trebuie să depășească 3-4 ore.

(9.5.2. Tehnica culturii cu fragmente de țesut direct pe sticlă folosește cu precădere țesuturi embrionare.

Se preferă recoltarea de la embrioni de 1 - 3 luni obținuți prin întreruperi de sarcină. După extragere, embrionul este depus într-un cristalizator steril, cu capac, care conține o soluție salină cu antibiotice.

Astfel ambalați, embrionii sau fragmentele de embrion trebuie să ajungă în cel mai scurt timp la laborator. Aici, cu ajutorul unor pense sterile se aleg fragmente de țesut embrionar îndepărtându-se cu atenție chiagurile de sânge; fragmentele curate se trec într-o altă cutie Petri sterilă care conține deasemeni soluție salină.

Operația de transvazare a fragmentelor se repetă de 2-3 ori dar de fiecare dată trebuie folosite alte instrumente sterile; prin aceste transvazări succesive se elimină chiagurile de sânge și porțiunile de țesut neutilizabile (strivite).

După ultima spălare, fragmentele se pun într-o eprubetă de centrifugă sterilă și cu ajutorul unor foarfeci sterili și bine ascuțiți se caută să se obțină o masă de aspect omogen.

Tegumentul embrionului trebuie considerat contaminat; sterilizarea lui se face cu alcool iodat, avînd grijă ca antisepticul să nu pătrundă în cavitățile embrionului după incizarea lui.

Cu ajutorul unei pipete Pasteur sau a unei anse sterile se ia o cantitate din suspensia de țesut embrionar care se întinde apoi pe una din suprafețele unui recipient de cultură steril (flacon de tip Kolle, Roux, etc); repartizarea suspensiei trebuie să fie cît mai uniformă.

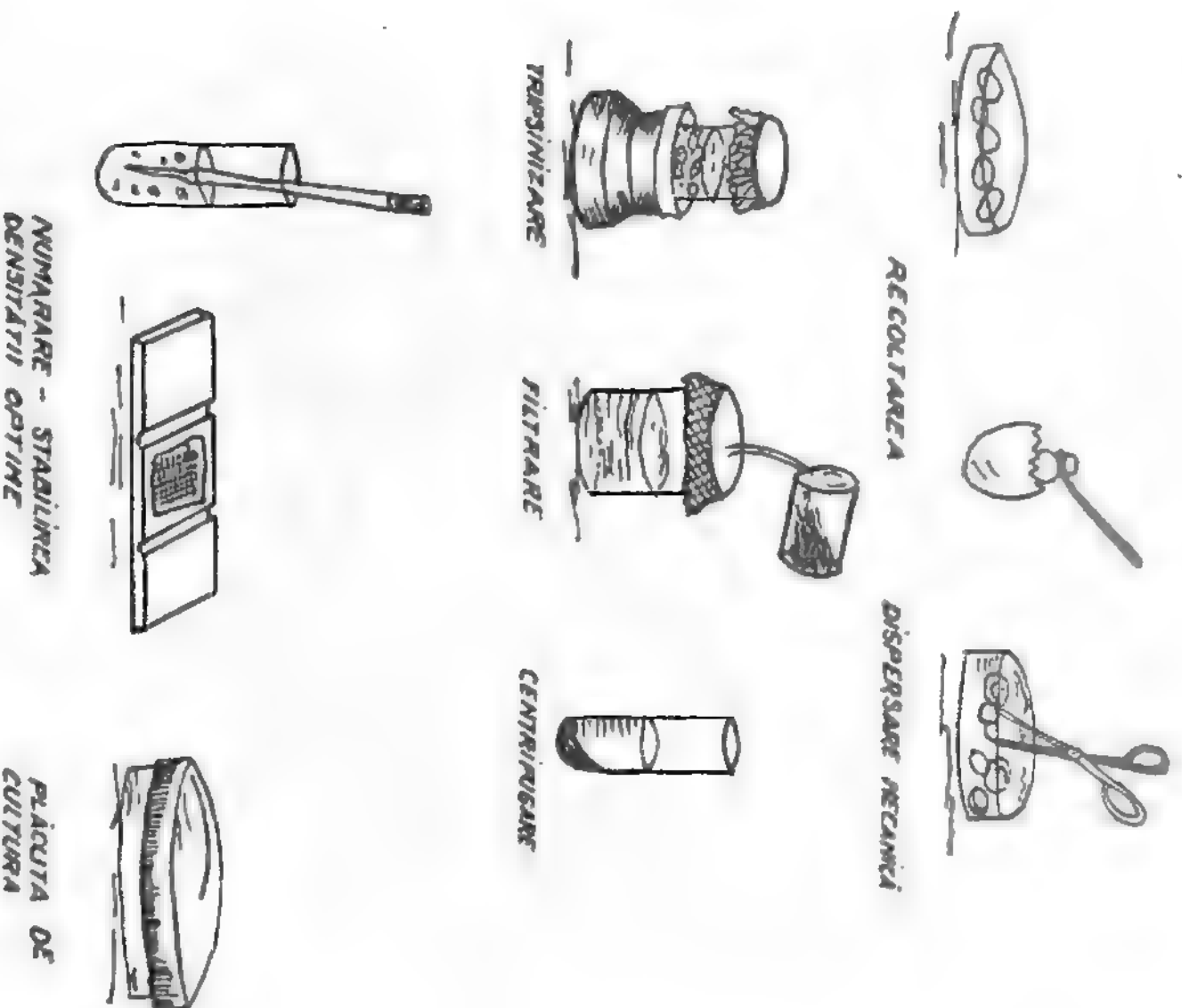


Fig. 9 - Etapele realizării unei culturi celulare

Recipientul, cu fața pe care este întinsă suspensia situată în jos se lasă la temperatura camerei sau la termostatul de 37°C timp de 30 - 60 minute. După trecerea acestui timp se introduce mediul nutritiv, avînd grijă ca el să nu antreneze fragmentele de pe sticlă.

Recipientele sînt astupate cu dop de cauciuc și incubate într-un termostaț la 37°C . În timpul incubării, recipientele nu trebuie mișcate din loc cel puțin 3-4 zile.

9.5.3. Controlul celulelor cultivate trebuie făcut înainte oricărui experiment. Se face :

(A.) Controlul mediilor

+ control pentru contaminanți (bacterieni, fungici, micoplasmatici și virusuri);

+ controale ale constantelor fizico-chimice (pH, proteine totale, etc);

+ controalele de eficiență sînt diferite, în raport cu ingredientul cercetat (soluții izotone tamponate, medii de creștere, etc); se face aprecierea densității celulare pe suprafața suportului, evaluarea eficienței de formare a coloniilor celulare, etc.

(B.) Controlul morfologic urmărește aspectul morfologic al celulelor din cultură. El se realizează prin :

(1.) Tehnici de microscopie optică :

+ examinarea celulelor în stare vie la microscopul cu contrast de fază (aprecierea formei celulelor,

gradul de granularitate a citoplasmei, conturul nucleului, etc.).

+ examinarea preparatelor fixate și colorate.

2. Tehnica de histoautoradiografie

3. Tehnici de microscopie electronică.

10. FRACTIONAREA CELULARA

(10.1. I n t r o d u c e r e

In biologia celulară cît și în alte domenii de cercetare (biochimie, genetică, etc), studiul diverselor componente celulare (organite, macromolecule) obținute prin metoda ultracentrifugării diferențiate are o mare valoare științifică.

Obținerea separată a organitelor (nuclei, mitocondrii, lizozomi, ribozomi, membrane, etc) sau a unor macromolecule A.D.N., A.R.N.), se realizează cu ajutorul ultracentrifugării diferențiate a celulelor. Aceasta trebuie să țină *cont* ca :

- + pentru o anumită structură biologică trebuie aleasă o soluție tampon cu o osmolaritate și cu un pH corespunzător;

- + toate operațiunile trebuie să se desfășoare la o temperatură de $0^{\circ} - + 4^{\circ}\text{C}$;

- + înaintea fracționării prin ultracentrifugare, soluțiile tampon și rotoarele ultracentrifugii trebuie răcite;

- + trebuie ales rotorul corespunzător care să asigure turația optimă în vederea obținerii fracțiunii celulare dorite;

- + ultracentrifugarea trebuie făcută în ultracentrifugi cu răcire.

Pentru obținerea fracțiunilor celulare trebuie

să se țină seama de forța de sedimentare (g) care este un multiplu al accelerației gravitaționale și care se calculează după formula :

$$g = 0,0001118 \times r \times n^2$$

(r) = raza rotorului exprimată în centimetri, măsurată de la fundul tubului la axul rotorului ;

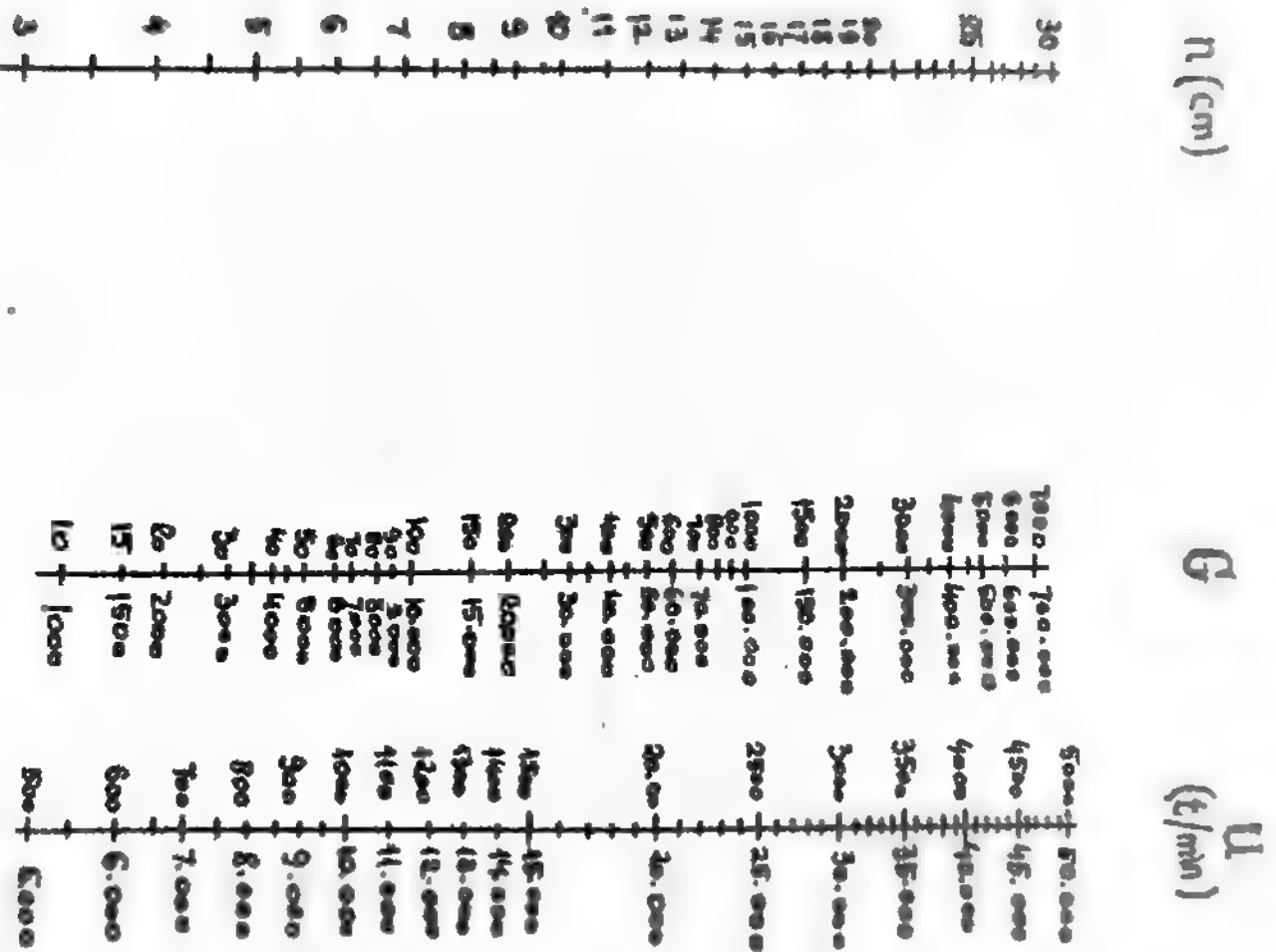
n(= numărul de rotații pe minut.

Convertirea turațiilor în G-uri se face cu ajutorul nomogramei. Nomograma este un instrument matematic în care sînt puse în relație cun număr de variabile.

Relația între variabile se stabilește cu un purtător de puncte care este o linie dreaptă. Cunoșcînd două din mărimi - raza și forța centrifugă (g) - cu purtătorul de puncte putem afla pe a treia variabilă, numărul de turații pe minut.

Redăm mai jos un tabel orientativ privind separarea unor componente celulare la diferite valori ale forței de sedimentare.

Denumirea particulelor	Forța de sedimentare (g)
Nuclei	300 - 1000
Mitocondrii	8000-13000
Microzomi)	70 000 - 150. 000
Acizi nucleici (



NOMOGRAMA

G

$$G = 1,11 \cdot 10^{-5} n \cdot U$$

10.2. Omogenizarea tesuturilor

Omogenizarea tesuturilor animale sau vegetale duce la formarea unui omogenat realizat prin distrugerea structurii tisulare și ruperea membranelor celulare.

Omogenatul trebuie să păstreze localizarea particulelor subcelulare și să conserve structura chimică a substanțelor.

Recoltarea tesutului de prelucrat trebuie făcută într-un timp cât mai scurt și la o temperatură de $+4^{\circ}\text{C}$ care se va menține constantă în toată perioada fracționării.

Ruperea membranelor celulare se realizează prin trei metode :

- + prin șoc osmotic obținut prin îngheț-dezghet;
- + prin omogenizare mecanică ;
- + prin ultrasunete.

Cel mai utilizat procedeu este omogenizarea mecanică care se realizează zdrobirea tesutului cu ajutorul omogenizatoarelor coaxiale de tip POTTER. Timpul de omogenizare variază în funcție de organ, de la 1 la 5 minute.

10.2.1. Tehnica omogenizării. Pentru omogenizare se pot utiliza aproape toate tesuturile și organele ca mușchi, creier, rinichi, tiroidă, etc.

Mediile în care se face omogenizarea precum și sticlăria pentru lucru se păstrează la rece ($+4^{\circ}\text{C}$).

Fragmentul de țesut sau organ prelevat imediat după sacrificarea animalului de experiență de pe care se îndepărtează fasciculele conjunctive și straturile adipoase, se spală de câteva ori în ser fiziologic rece; cu ajutorul unui foarfec. ascuțit se caută să se obțină fragmente cât mai mici.

Un gram din fragmentele astfel obținute se transvazează în eprubeta omogenizatorului (care trebuie să aibă pereții suficient de groși) în care se află o soluție de sucroză 0,3 M sau de zaharoză 0,25 M. Cu ajutorul omogenizatorului coaxial se face omogenizarea timp de 2-5 minute și la o turație de 1500 - 3000 ture pe minut. (Fig.10).

Pentru determinări enzimatică, omogenatul obținut se centrifughează timp de 5-10 minute la 700 g.; sedimentul va conține celule întregi, nuclei și resturi celulare.

Interpretarea corectă a rezultatelor determinărilor biochimice făcute pe omogenat necesită standardizarea materialului. Ea se face prin :

+ raportarea la greutatea produsului de plecare sau standard de preparare;

+ raportarea la conținutul proteic al omogenatului

10.2.2, Ultracentrifugarea diferențială reprezintă cea mai simplă metodă cu ajutorul căreia, din omogenat se separă un supernatant în care se găsesc particule cu greutate moleculară mai mică și un sediment unde se află particule cu greutate moleculară mai mare.

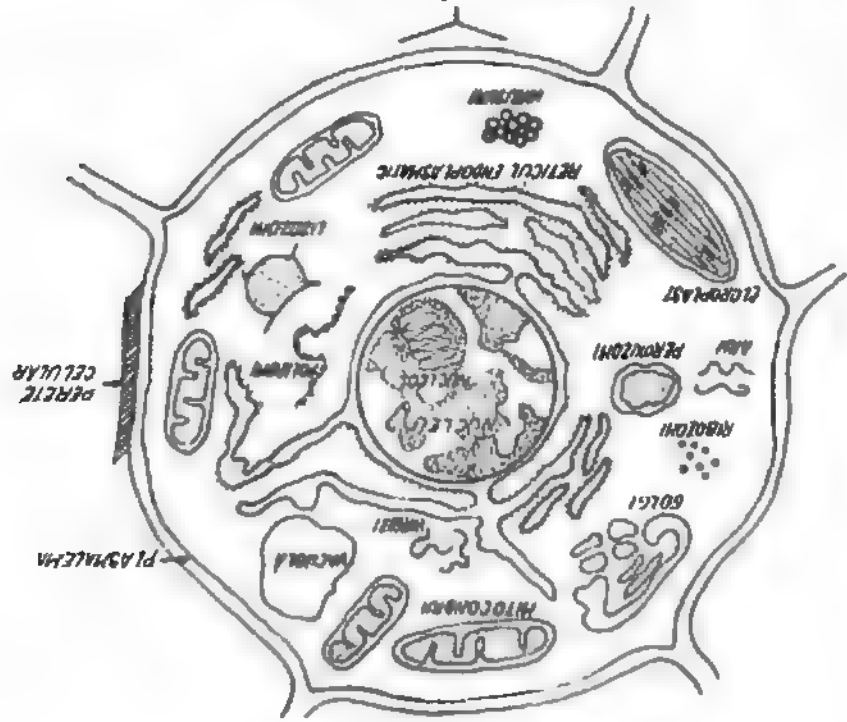
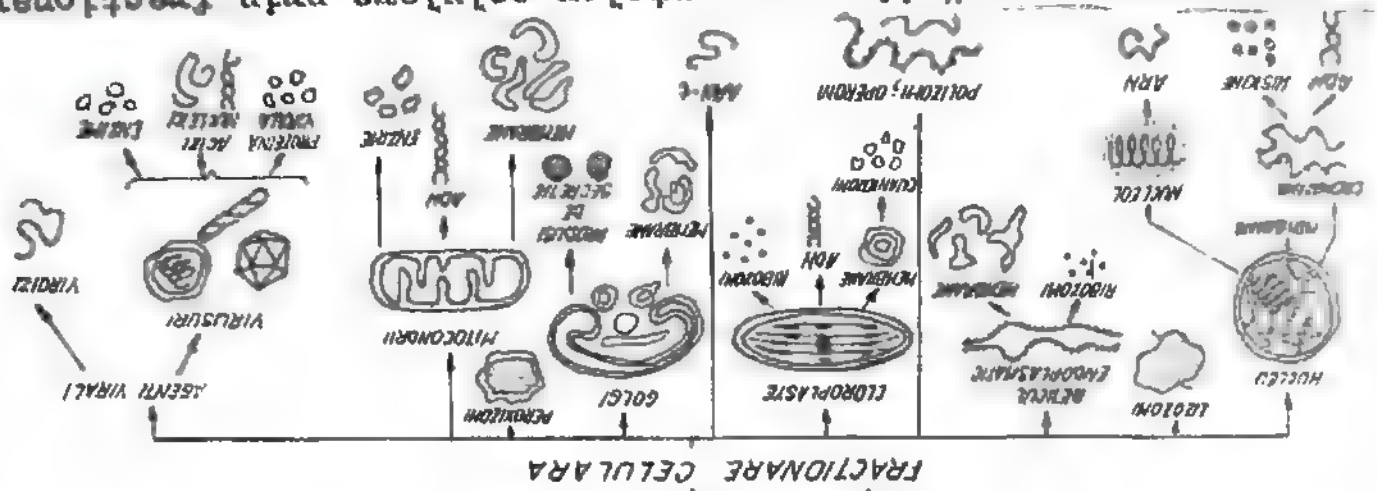


Fig. 10. Schema separati componentelor celulare prin fractionare celulara.



După o primă ultracentrifugare, atât supernatantul cât și sedimentul pot fi supuse la alte fracționări.

10.2.2.1. Nucleii celulelor animale se obțin după următoarea tehnică: țesutul se omogenizează și se centrifughează apoi timp de 10 minute la 1 000 g. Supernatantul se îndepărtează iar sedimentul se suspendă într-o soluție care cuprinde 200 ml soluție de omogenizare și 1,26 ml n - octil - alcool, omogenizându-se din nou ; se centrifughează timp de 10 minute la 1000 g obținându-se un sediment care conține nucleii într-un procent ridicat. Supernatantul se îndepărtează.

Sedimentul astfel obținut se mai centrifughează încă de două ori a 10 minute și la 1 000 g, schimbând de fiecare dată mediul de omogenizare în care nu se mai adaugă n - octil - alcool. După ultima centrifugare sedimentul este format numai din nucleii.

10.2.2.2. Mitocondriile se obțin în felul următor : se omogenizează fragmente de cord în tampon Tris - HCl (pH = 7,6) cu sucroză 0,25 M (10 gr fragmente cord la 100 ml lichid de omogenizare); produsul obținut se filtrează prin tifon iar filtratul se centrifughează la 800 gr timp de 10 minute.

Supernatantul obținut se centrifughează la 6 000 g timp de 15 minute iar sedimentul se resuspendă în amestecul sucroză 0,4 M cu E.D.T.A. 0,01 M la pH = 7,6.

Se ultracentrifughează timp de 20 minute la 15 000 g iar sedimentul se dizolvă în tampon Tris-HCl cu pH = 7,6 în care se adaugă sucroză 0,25 M. Sedimentul conține foarte multe mitocondrii.

10.2.2.3. Lizozomi. La șobolanii de experiență se injectează timp de 10 zile o soluție de fier ; în a doua zi după ultima injectare se recoltează parenchim hepatic care se omogenizează în sucroză 0,3 M. Se ultracentrifughează la 100.000 g iar în sedimentul obținut se găsesc mulți lizozomi.

10.2.2.4. Ribozomi. Se obțin după o centrifugare de 18 ore la 105 000 g.

10.2.2.5. Cromatina. (Sedimentul cu nucleu obținut prin tehnica descrisă la capitolul 10.2.2.1. suspendat în soluție tampon, se ultracentrifughează de trei ori la 12 000 g, 54 000 g și 120 000 g. Sedimentul obținut după a treia centrifugare conține cromatina pură.

10.3. Studiul fracțiunilor celulare

Toate structurile celulare obținute prin tehnica ultracentrifugării diferențiale pot fi studiate atât din punct de vedere morfologic cu ajutorul microscopului electronic, cât și din punct de vedere biochimic.

celulare este posibilă datorată tehnicilor de prelucrare a materialelor biologice pentru microscopia electronică precum și tehnicilor de colorare negativă.

Colorarea negativă. Metoda "colorării" negative folosită și în studiul fracțiunilor celulare, constă în depunerea unui preparat biologic transparent la fluxul de electroni pe un pat "colorant", dens electronomic și apoi examinarea lui la microscopul electronic. Preparatul rămâne transparent iar fondul întunecat.

De exemplu, cromatina obținută prin ultracentrifugarea diferențială a nucleilor se poate studia la microscopul electronic depunând sedimentul pe grilă și "colorându-l" negativ. Ea va apărea sub forma unui lanț flexibil de particule sferice (nucleozomi) legate prin molecule de A.D.N.

Există mai multe metode de colorare negativă, una din ele fiind colorarea directă. Tehnica este următoarea: cu ajutorul unei micropipete se amestecă în părți egale preparatul biologic suspendat într-un tampon volatil (acetat, carbonat, etc... de amoniu) cu soluția de "colorant" (acid fosfotungstic, acetat de uraniu, etc... în apă distilată) ; o picătură din amestecul rezultat se depune pe o grilă (preferabil de 400 mesh și cu peliculă de cărbune) și se lasă 15-20 secunde după care, excesul de lichid se îndepărtează cu hârtie de filtru prin atingerea marginii grilei.

Cu ajutorul acestor metode se pot evidenția fracțiunile electroforetice ale acizilor nucleici, separarea și identificarea acizilor amino prin cromatografie, activități enzimetice, etc.

10.3.2. Studiul biologic se realizează în special cu ajutorul metodelor fizico-chimice de analiză. Acestea se clasifică în :

- + metode optice (colorimetrice, spectrofotometrice, etc.);
- + metode electrochimice (electroforeze);
- + radichimice;
- + cromatografice.

25.04.'89

11. C E L U L A

(Organizare generală, formă, dimensiuni, număr,
 învelișul celular)

11.1. I n t r o d u c e r e

Celula reprezintă unitatea morfologică și funcțională a lumii vii, ea fiind alcătuită din:

I. - Invelișul celular care separă mediul intracelular de cel extracelular;

II. - Protoplasma, la nivelul căreia se desfășoară principalele reacții chimice (biosinteza proteică, fosforilarea oxidativă, etc.); ea formează :

1.- nucleul ;

2.- citoplasma.

La rândul său, citoplasma se prezintă sub două aspecte :

a.- citoplasma nestructurată sau hialoplasma (substanța fundamentală a citoplasmei);

b.- citoplasma structurată sau morfoplasma, care formează organele celulare cu rol în îndeplinirea unor anumite funcții; acestea sînt : reticulul endoplasmatic neted și rugos, ribozomii sau corpusculii lui Palade, mitocondriile, lizozomii, peroxizomii, complexul Golgi, centrul celular sau centrozomul, microtubii și microfilamentele.

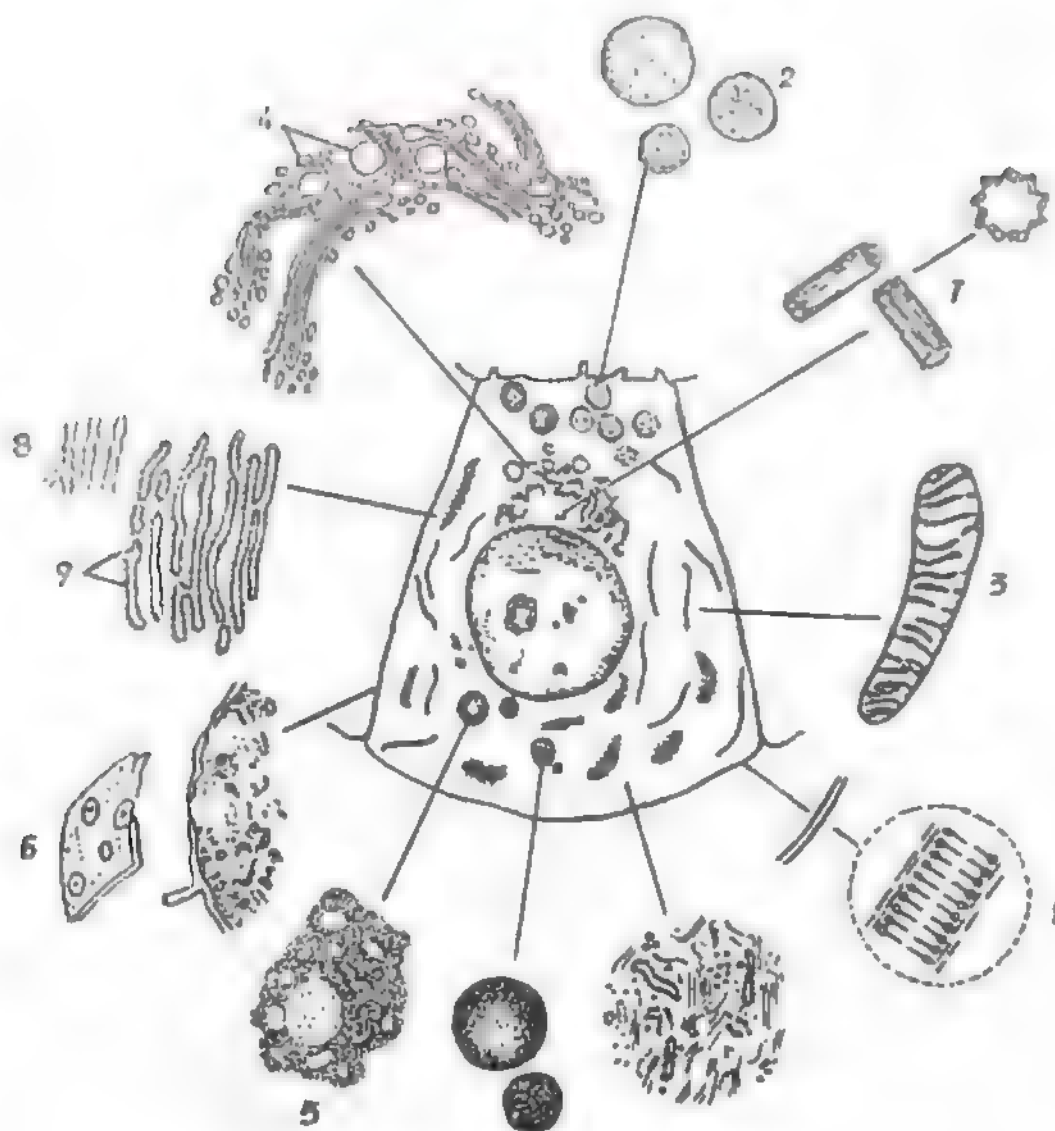


Fig. 11. Reprezentarea schematică în M.O. și M.E. a unei celule.

1. Plasmalema; 2. Granule de secreție;
3. Mitochondrii; 4. Complex Golgi; 5. Nucleol;
6. Cromatină și înveliș nuclear; 7. Diplosom;
8. Reticul endoplasmatic neted (R.E.N.) ;
9. Reticul endoplasmatic rugos (R.E.R.).

În afara organelor celulare, în citoplasmă se pot găsi incluziunile celulare, care reprezintă substanțe de rezervă (picături de grăsime, granule de glicogen), produse de secreție (pigmenți), acumulări de produși exogeni (particule de cărbune, siliciu).

11.2. F o r m a c e l u l e l o r

Forma celulelor este foarte variată datorită funcțiilor și raporturilor diferite dintre ele precum și caracterelor fizico-chimice ale mediului în care își desfășoară activitatea. ◀

Intr-un organism pluricelular există :

1.- Celule cu forme schimbătoare, care fac parte din grupul celulelor care își desfășoară activitatea într-un mediu lichid (celulele sanghine). În mod obișnuit aceste celule au o formă sferică sau ovalară. Părăsind vasul și trecând în țesuturi, leucocitele polimorfonucleare sau granulocitele (în special cele neutrofile) își modifică forma căpătând un contur neregulat prin emiterea pseudopodelor.

Un alt exemplu îl constituie epiteliul mucoasei și vezicii urinare care se aplatizează în momentul în care ea se destinde prin acumulare de urină.

2. - Celule cu forme fixe, reprezintă marea majoritate a celulelor dintr-un organism pluricelular. Forma lor variază în funcție de natura celulelor, a funcțiilor specifice și a influențelor mecanice exercitate de elementele vecine. Se întâlnesc :

11.3. Dimensiunile celulelor

Talia celulelor variază de la un tip celular la altul. In organismul uman, cele mai mici celule sînt cele din stratul granular al scoarței cerebeloase al căror diametru este cuprins între 3 - 4 microni.

Cele mai frecvente dimensiuni sînt cuprinse între 35 - 40 microni (celule primateice ale epitelului intestinal).

Neuronii din stratul piramidei al scoarței cerebrale măsoară aproximativ 10 microni.

Ovulul, cea mai mare celulă din organismul uman poate fi văzută cu ochiul liber ajungînd la dimensiuni

a/. - celulele infante (ovulul, celula ercă sau adipoctul, epimioctele din torentul ctoculator);

b/. - celulele poliedrice, cubice și prismatice intră în alcătuirea tesutului epitelial din epiteliile stratificate, de acoperire, canale exterioare a glandelor salivare, epiteliul mucoaselor gastrice și intestinale);

c/. - celulele pavimentose sau parte la formarea seroaselor (pleură, pericard seros), endotelul vascular, epiteliul fetei parietale a capsulei lui Bowman (corpusul renal - Malpighi);

d/. - celulele fuziforme au partea centrală mai îngroșată iar cele două capete efilate (celula musculară netedă) ;

e/. - celule cu prelungiri (celula nervoasă, osteocitul).

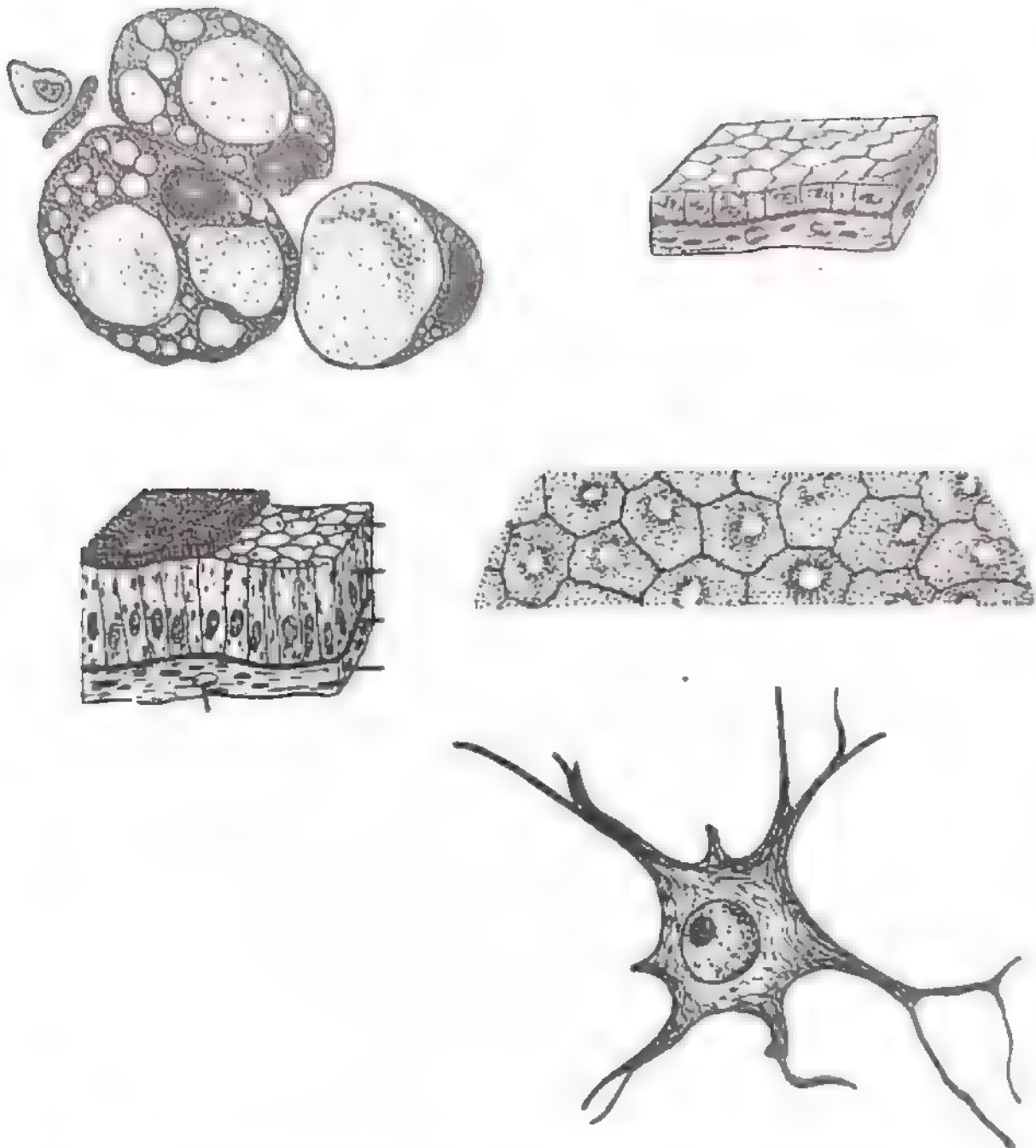


Fig. 12. Diferite tipuri de forme celulare:
 a/adipocit; b/epiteliu cubic 1;
 c/epiteliu prismatic; d/mezoteliu ;
 e/miocite netede; f/neuroni.

de 150 - 200 microni. Volumul celular variază între 250 - 15 000 microni³.

În general talia și volumul sînt constante pentru același tip celular. În anumite situații ca de pildă intensificarea proceselor metabolice care au drept consecință schimbarea raportului nucleoplasmatic, talia și volumul celulei se modifică.

11.4. N u m ă r u l c e l u l e l o r

Este variabil în raport de specie și în general același la indivizi din aceeași specie. Un organism adult are aproximativ 200 miliarde de celule.

11.5. I n v e l i s u l c e l u l a r

Invelișul sau periferia celulară este partea din celulă care separă mediul intracelular de cel extracelular.

În microscopia electronică, periferia celulară apare ca o structură foarte complexă căreia Bennett (1962) îi distinge două componente:

1.- plasmalema sau membrana celulară care vine în raport direct cu mediul intern al celulei;

2.- glicocalixul situat pe partea externă a plasmalemei și care vine în contact cu mediul extracelular.

(11.5.1. Plasmalema

Microscopia optică nu poate oferi detalii de structură, deoarece membrana celulară are o grosime

foarte mică (0,1 - 0,2 microni) iar puterea de mărire și de rezoluție a microscopelor este relativ redusă.

Pe preparatele examinate la microscopul electronic se apare cu o structură trilamelată, suprafața ei externă fiind acoperită de un fin strat granular sau filamentos, glicocalixul ; are o grosime de 75 - 200 Å.

În alcătuirea ei intră două straturi osmiofile, dense la fluxul de electroni, între care se găsește al treilea strat, osmiofob, puțin dens electronomicroscopic.

Straturile osmiofile sînt formate din molecule proteice iar stratul osmiofob este alcătuit din molecule de glicofosfolipide (fig.13.).

Membrana celulară este o membrană biologic activă, care pe lîngă funcția de frontieră dintre cele două medii: intracelular și extracelular, reprezintă și o barieră cu permeabilitatea variabilă pentru diverse substanțe. Datorită acestei calități, prin plasmalemă se realizează :

- a/ transportul substanțelor în ambele sensuri
- b/ transportul de informații (hormonii care impun celulei țintă o modificare în activitatea sa.).

(11.5.2. Glicocalixul

Glicocalixul este o pătură glicolipoproteică situată la suprafața membranei plasmactice, de a cărei integritate depinde activitatea fiziologică a celulei.

Datorită conținutului bogat în mucopolizaharide,

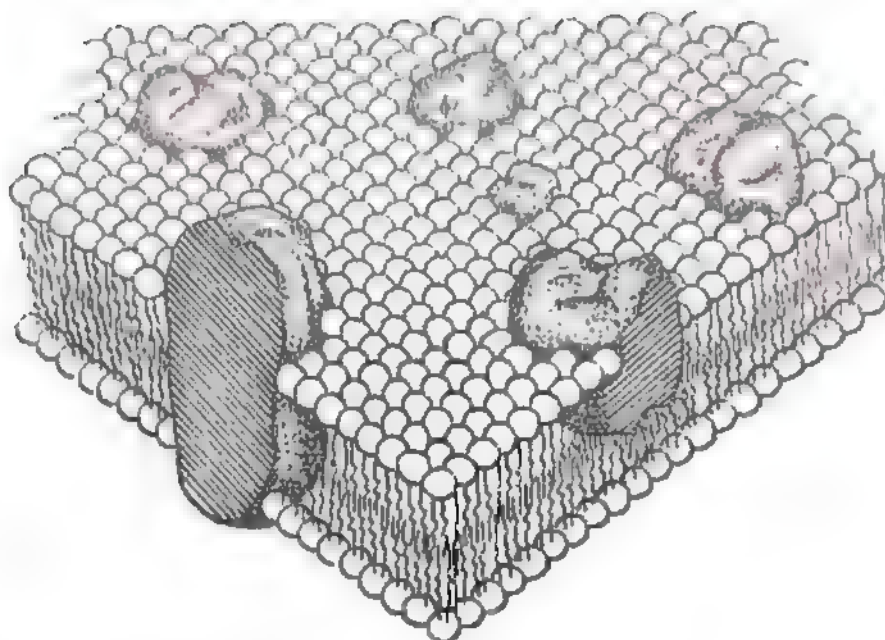


Fig. 13. Modelul în mozaic a lui Singer și Nicolson
1. dubla pătură lipidică ; 2. proteine globulare;

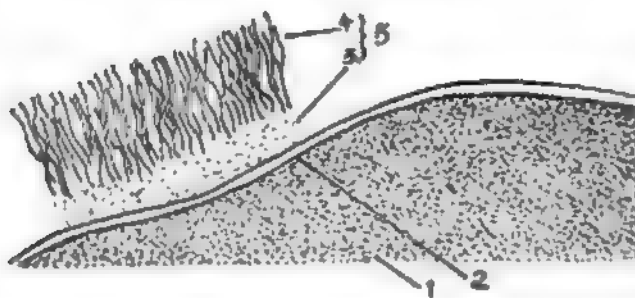


Fig. 14. Membrana plasmatică și glicocalixul.
1. mediul intracelular; 2. membrana plasmatică;
3. zona amorfă ; 4. zona externă; 5. glicocalix.

glicocalixul poate fi observat și în microscopia optică prin folosirea tehnicilor histochemice de evidențiere a acestor substanțe (reacția P.A.S., fier coloidal, etc.), (fig. 14.).

La microscopul electronic glicocalixul se prezintă sub forma unui material fibrilar. Filamentele sale fine de ordinul angstromilor se întretaie formând o rețea; ele se dispun perpendicular pe plasmalemă de a cărei foiță externă aderă.

Glicocalixul este mai dezvoltat la polul apical al enterocitelor, nefrocitelor, etc. Este mai slab reprezentat la locul de contact al celulelor.

11.6. Specializările membranei celulare

Specializarea este o diferențiere structurală sau o transformare morfologică complexă care conferă celulei o anumită funcție; se clasifică în : permanente și temporare. Cele permanente se găsesc la nivelul:

- la nivelul plasmalemei polului apical;
- " " plasmalemei polului bazal ;
- " " contactului plasmalemelor a două celule vecine.

11.6.1. Specializările plasmalemei apicale.

Reprezintă diferențieri ale membranei și citoplasmei superficiale asigurând celulei o funcție precisă (exemplu - funcția rezorbtivă).

Ele sînt reprezentate prin :

1. microvilozităţi, izolate sau foarte numeroase (platou striat, marginea în perie, stereocili).

2. cili vibratili şi flageli.

1.- Microvilozităţile sînt expansiuni citoplasmice cilindrice limitate de plasmalema apicală care se întîlnesc la polul apical al enterocitelor (platou striat), al nefrocitelor (margine în perie) etc. Ele intervin în special în fenomenele de absorbţie măbind suprafaţa acestora. (fig. 15).

a.- În microscopia optică platoul striat apare sub forma unei zone cu striatii perpendiculare pe suprafaţa plasmalemei.

În microscopia electronică, această zonă este alcătuită din numeroase microvilozităţi, fiecare din ele avînd o lungime de 0,6 - 0,8 microni şi un diametru de 80 - 100 milimicroni.

Microvilii sînt limitaţi la periferie de membrana plasmatică trilamelată. Citoplasma lor prezintă o zonă periferică de 200 - 300 Å grosime, lipsită de structură şi o zonă centrală care conţine 10 - 15 microfilamente.

b.- Marginea în perie are microvili de dimensiuni inegale.

c.- Stereocili sînt expansiuni citoplasmice imobile a căror formă şi structură se aseamănă cu cea a microvililor. Se aglomerează mai mulţi la un loc şi formează un fel de tufe ghidînd direcţia de evacuare a produşilor de secreţie. Microfilamentele miezului sînt dispuse neregulat.

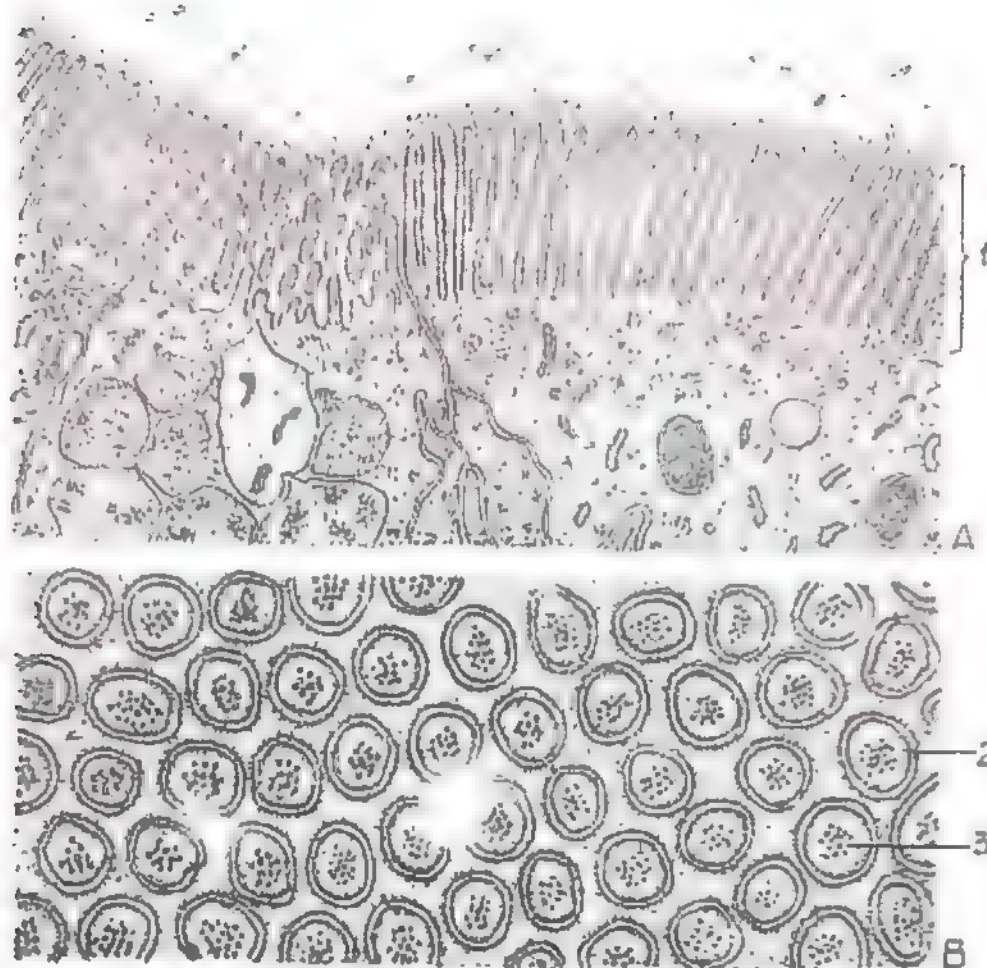


Fig. 15. Microvilozitate.

A/ Secțiune longitudinală ;

B/ Secțiune transversală

- 1. microtubi**
- 2. plasmalemă**
- 3. microfilamente**

Stereocilii se găsesc la polul apical al celulelor epiteliale din epididim și canalele deferente, la celulele de susținere ale epiteliului olfactiv, etc.

(2.- Cilii vibratili sînt expansiuni citoplasmatiche mobile delimitate de plasmalemă, care prezintă mișcări pendulare sau ondulatorii. Se găsesc la polul apical al epiteliului căilor aeriene superioare, trompa uterină, etc. Au o lungime de 5-10 microni și grosimea de 0,5 microni cu excepția cozii spermatozoidului. Ei se compun din :

- + - o tijă ;
- + - o zonă de tranziție;
- + - un corpuscul bazal sau centru cinetic;

- Tija cilului are forma unui vîrf de flacără de luminare și delimitat la periferie de membrana celulară trilamelată. Citoplasma se diferențiază în două zone;

- + la periferie o matrice puțin densă la fluxul de electroni ;
- + la centru, complexul filamentos axial format din 10 perechi de microtubi dispuși în două grupuri;
- + o pereche de microtubi centrali de 200 Å;
- + 9 perechi de microtubi periferici.

- Zona de tranziție este situată între tijă și corpusculul bazal.

- Corpusculul bazal are o lungime de 5 000 Å și o lărgime de 1 200 - 1 500 Å. Are o formă cilindrică iar peretele său este constituit din 9 triplete de tuburi (dubletele din tija cilului ajung în corpusculul bazal unde li se adaugă încă un microtub pentru ficare, realizînd un model similar cu acela care caracterizează centriolii).

- Rădăcina ciliară este formată din tripletele corpusculului bazal care trec în citoplasma apicală.

11.6.2. Specializări ale plasmalemei bazale

La anumite tipuri celulare, care joacă rol deosebit în transportul activ al substanțelor, plasmalema bazală se invaginează mai mult sau mai puțin profund împărțind citoplasma în compartimente care poartă numele de labirint bazal. În labirintul bazal se găsesc numeroase mitocondrii (nefrocitele tubului contort distal al nefronului).

11.6.3. Specializări ale plasmalemei și adezivitatea celulară

Celulele de același tip sînt separate unele de altele prin spații intercelulare (prin care circulă lichidul intercelular care transportă elemente nutritive, produși de secreție și deșeuri (întrerupte în anumite zone de aderență sau de joncțiune).

Tipurile de joncțiuni celulare sînt numeroase; mai frecvent întîlnite sînt următoarele : (fig.16).

- (+ desmozomii ;
- + joncțiunile etanșe ;
- + joncțiunile cu goluri;
- (+ joncțiunile intermediare.

Desmozomii reprezintă sistemele cele mai complexe de joncțiuni celulare. Cel mai frecvent ei se găsesc sub formă maculară, ovalară, cu diametrul mare de 4 000 - 5 000 Å și diametrul mic de 1 500 - 1 900 Å.

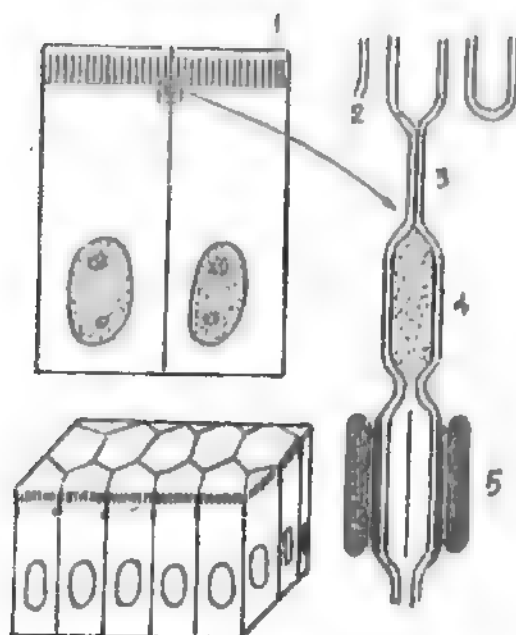


Fig. 16. Diferite tipuri de joncțiuni celulare

- 1/ Platou striat ; 2/ Cadru celular;
3/ Joncțiuni etanșe ; 4/ Joncțiuni cu
goluri; 5/ Desmozom .

La microscopul electronic se constată că plasmalemele celulare alăturate nu fuzionează, ele stabilind contacte numai prin intermediul glicocalixului.

Aspectul morfologic al desmozomului este următorul :

+ între plasmalemele celulelor alăturate se găsește o bandă densă electrono-microscopio numită lamela centrală; ea reprezintă locul unde microfibrilele glicocalixului celor două celule vecine se întrepatrund.

+ plasmalemele alăturate prezintă o îngroșare, în special la nivelul foițelor interne;

+ citoplasma la nivelul desmozomului este mai densă constituind placa citoplasmatică separată de plasmalemă printr-un spațiu clar;

+ microfibrilele intracelulare pătrund în placa citoplasmatică unde formează o ansă, după care se întorc din nou în citoplasmă.

Desmozomii sînt structuri care se întîlnesc la nivelul epiteliiilor endoteliilor și mezoteliilor dar cu un grad diferit de diferențiere.

Interdigitațiile se observă în unele structuri tisulare în care plasmalemele alăturate au un contur sinuos și se angrenează una cu cealaltă după modelul roților dințate.

Interdigitațiile reprezintă o rezervă de suprafață celulară utilizabilă în cazul expansiunii cavităților pe care le delimitează. De exemplu la nivelul epiteliului vaginal, interdigitațiile sînt extrem de complexe ; spațiile cuprinse între celule reprezintă canalicule care, funcțional, joacă un rol foarte important în metabolismul lor.

Diferențierile temporare sînt considerate pseudopodele granulocitelor precum și mișcările plasmalemei din endocitoză și exocitoză.

12. NUCLEUL IN INTERFAZA

12.1. I n t r o d u c e r e

Nucleul, unitate structurală și funcțională, este centrul vital al celulelor eucariote, cu excepția eritrocitelor adulte. El conține informația genetică și are o influență hotărâtoare asupra activității metabolice din citoplasmă.

La procariote ei posedă echivalenți ca de exemplu : granulațiile cromatice la protozoare, nucleozii la bacterii, A.D.N.-ul viral.

Nucleul este locul unde se află memoria genetică necesară atât în procesul diferențierii celulare cât și pentru funcționarea normală a celulei.

Se poate afirma cu toată convingerea că expresia organizării fundamentale a materiei vii o reprezintă legătura strânsă dintre A.D.N-ul nuclear și citoplasma, condiție absolut necesară supraviețuirii.

Nucleului i se descriu două stări funcționale care trec dintr-una în alta la începutul și la sfârșitul fiecărei mitoze.

(a/. forma metabolică în care se desfășoară procese de sinteză care pregătesc diviziunea celulară și

(b/. forma mitotică.

12.2. Forma nucleului

Forma nucleului este variată, urmărind în mod obișnuit forma celulei în care se găsește.

Ca și celulele, nucleul poate îmbrăca următoarele forme: (fig.17).

+ sferică în celulele sferice (ovocit, leucocite tinere), cubice (tireocit), poliedrice (hepatocit);

+ ovalară în celulele prismatice ale epitelului intestinal;

+ bastonaș sau fuziform în celulele musculare (miocite);

+ polilobat în leucocitele mature (granulocite) în care nucleul este alcătuit din 2 - 5 lobi, mai mult sau mai puțin separați între ei.

Forma nucleului depinde de tipul celulei, de vîrsta și de ciclul funcțional. De exemplu, celulele secretorii aflate în plin proces de sinteză au un nucleu cu contur neregulat; în fibra musculară aflată în contracție nucleul suferă o răsucire.

În mod obișnuit, în celulă nucleul ocupă o poziție centrală, poziție care poate fi modificată de numeroși factori dintre care amintim:

+ acumularea de granule secretorii (în celulele glandulare cu secreție exocrină nucleul este dispus bazal);

+ acumularea de substanțe de rezervă (în adipocit nucleul este împins la periferia celulei și capătă formă de disc).

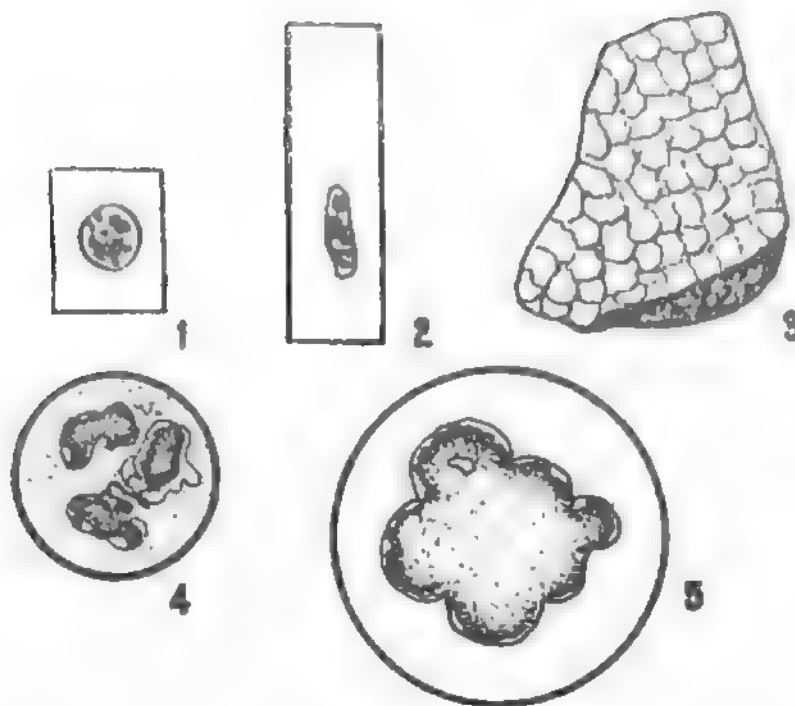


Fig. 17. Diferite forme de nucleu.

1/ rotund; 2/ ovalar; 3/ turtit;
4/ lobat.

12.3. Dimensiunile nucleului

Talia și volumul nuclear variază de la un tip celular la altul, depinzând de faza ciclului celular, în care se găsesc precum și de activitatea lui funcțională.

În general, dimensiunile nucleilor sînt cuprinse între 3 și 20 - 25 micrometri. În celulele granulare din cerebel talia nucleului nu depășește 2-3 micrometri, nucleul spermatozoidului are 4 micrometri, iar ovulul are un nucleu care măsoară 20 - 25 micrometri.

Talia și volumul nucleilor sunt în funcție de dimensiunile celulelor; cu alte cuvinte trebuie să existe un raport nucleo-plasmatic (N.P.) care este constant pentru fiecare tip celular în parte. El poate fi calculat cu ajutorul indecelui nucleo-plasmatic.

$$N.P. = \frac{V_n}{V_c - V_n} = 1/3 \text{ pînă la } 1/20 = 1/30$$

V_n = volumul nuclear ; V_c = volumul celulei.

În cazul în care volumul celulei crește mai mult decît volumul nucleului, raportul nucleo-plasmatic va fi refăcut printr-o diviziune celulară sau printr-o creștere a volumului nuclear.

12.4. Numărul nucleilor

Marea majoritate a celulelor corpului uman au un singur nucleu (mononucleate). Fac excepție eritrocitele adulte care au pierdut nucleul în vederea adaptării la funcția de transportor al oxigenului (anucleate).

La unele tipuri celulare cu activitate mai intensă există doi nuclei (binucleate) ca de exemplu în hepatocite sau în unii neuroni din ganglionii simpatici.

Unele celule conțin în citoplasma lor mai mulți nuclei (celule multinucleate). De exemplu celula musculară striată conține nuclei de ordinul sutelor. După modul lor de formare, celulele multinucleate se clasifică în plasmodii și sinciții.

(+ plasmodiul rezultă dintr-o celulă mononucleată în care au loc mai multe diviziuni nucleare neînsoțite însă și de citodiereză (celula musculară striată, osteoclastul) .

(+ sincițiul rezultă din contopirea mai multor celule într-o masă comună (sincițiul trofoblastic de la suprafața vilozităților placentare).

Creșterea numărului de nucleu se datorește fie unei creșteri a activității metabolice (hepatocit) fie ca o necesitate de informație genetică nucleară pentru sinteza proteinelor (celula musculară striată, sincițiul trofoblastic).

12.5. Structura nucleului în interfază

Atât în microscopia optică cât și în cea electronică nucleul apare format din :

1. înveliș nuclear sau nucleolema;
2. cromatina ;
3. nucleoli;
4. sucul nuclear sau carioplasma.

12.5. 1.) Invelișul nuclear

Invelișul nuclear este un complex membranar trilamelat caracteristic celulelor eucariote, care controlează schimburile dintre nucleu și citoplasmă.

În microscopia fotonică nucleolema apare sub forma unei linii fine care separă conținutul nucleului de citoplasmă în perioada interfazică.

În microscopia electronică nucleolema este alcătuită din :

a/ o membrană externă cu o grosime de 75 Å, trilamelată formată dintr-o foiță centrală osmiofobă acoperită pe ambele fețe de câte o foiță osmiofilă;

membrana externă se continuă cu membranele reticulului endoplasmatic și pe fața care vine în contact cu citoplasma se găsesc atașați ribozomii.

b/ o membrană internă avînd o structură identică cu precedenta (fig. 18).

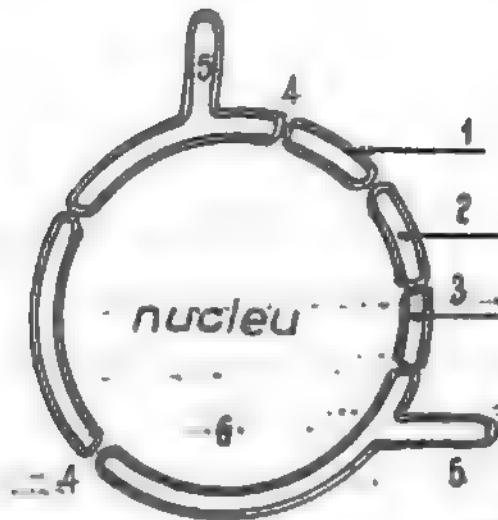


Fig.18. Învelișul nuclear

1/ membrană externă; 2/ cisterna perinucleară ;
3/ membrana internă; 4/ pori ; 5/ reticul endoplasmatic
6. nucleoplasma.

(c/ un spațiu numit cisternă perinucleară delimitat de cele două membrane și care comunică cu cavitățile reticulului endoplasmatic.

(d/ porii nucleari, nivel la care membranele externe se continuă cu cele interne.

Grosimea totală a învelișului nuclear este de aproximativ 350 Å.

Porii nucleari sînt structuri complexe apărute datorită unor zone de întrerupere a învelișului nuclear

limitați la periferie de o formațiune inelară. Ei intervin în reglarea schimburilor dintre nucleu și citoplasmă.

Numărul lor este proporțional cu activitatea celulei; cu cât o celulă este mai activă, cu atât numărul porilor va fi mai mare demonstrând astfel că ei sînt structuri dinamice și nu statice.

Porii sînt alcătuiți din următoarele structuri:

- + materialul inelar ;
- + diafragma ;
- + elemente centrale.

a/ Materialul inelar este format din 16 particule sferice de 200 Å diametru, dispuse cîte 8 pe fiecare deschidere a porului. Particulele sînt alcătuite din microfibrile cu traiect foarte sinuos.

b/ Diafragma este formată dintr-o substanță densă, amorfă care se inseră pe conturul porului și se dirijează către centru.

c/ Granula centrală de 250 Å ocupă centrul porului.

d/ Materialul fibrilar este reprezentat prin microfibrile care unesc granula centrală de granulele periferice. (Fig. 19).

Porii joacă un rol important în schimburile nucleoplasmice și în transferul de informații.

12.5.2. Cromatina

Examenul în microscopia optică a nucleilor fixați și tratați pe coloranți bazici indică existența

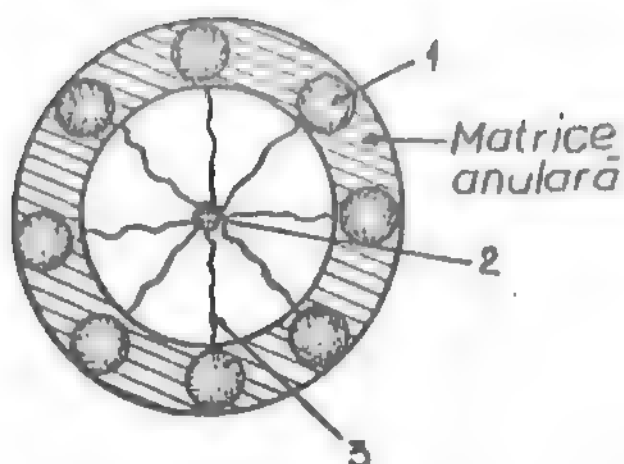


Fig. 19. Structura porului

- 1/ granule periferice; 2/ granula centrală ;
3/ elemente fibrilare.



Fig. 20. Diferite aspecte ale cromatinei

- 1/ cromatină fin granulară; 2/ cromatină în bulgări;
3/ cromatină în rețea.

unei substanțe intens bazofilă numită cromatină.
(Fig. 19).

În același nucleu, cromatina poate îmbrăca două aspecte morfologice care reprezintă stări funcționale diferite:

+ heterocromatina sau cromatina condensată sub

formă de bulgări de diferite dimensiuni sau cromocentre; ea reprezintă cromatina metabolic inertă, inactivă genetic;

+ eucromatina apare constituită din granule fine, uniform dispersate ; este forma cromatinei biologic active.

Aspectul microscopic al cromatinei variază de la un tip celular la altul, cu vârsta și starea ei funcțională.

În celulele somatice femele se individualizează o masă cromatică cu diametrul de aproximativ 1 micron care se atașează nucleolului sau feții interne a membranei nucleare numită cromatina sexuală sau corpusculul Barr. Ea se poate pune în evidență pe frotiuri cu celule din mucoasa bucală sau din epiteliul vaginal, în care colorează intens cu cresyl violet și dă o reacție Feulgen pozitivă.

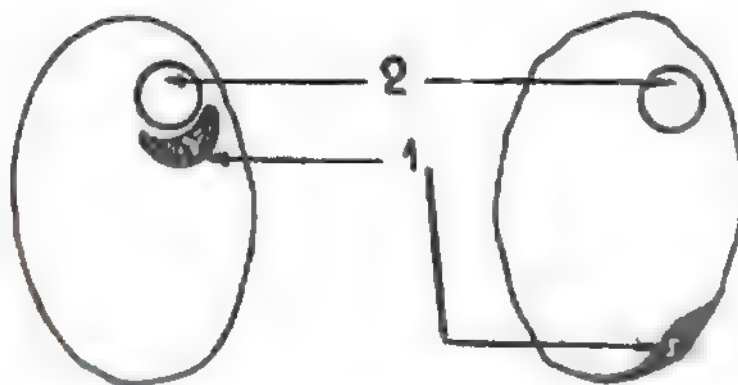


Fig. 21. Localizarea cromatinei sexuale.

1. corpuscul Barr; 2. nucleol

formă de bulgări de diferite dimensiuni sau cromocentre; ea reprezintă cromatina metabolic inertă, inactivă genetic;

+ eucromatina apare constituită din granule fine, uniform dispersate ; este forma cromatinei biologic active.

Aspectul microscopic al cromatinei variază de la un tip celular la altul, cu vârsta și starea ei funcțională.

În celulele somatice femele se individualizează o masă cromatică cu diametrul de aproximativ 1 micron care se atașează nucleolului sau feții interne a membranei nucleare numită cromatina sexuală sau corpusculul Barr. Ea se poate pune în evidență pe frotiuri cu celule din mucoasa bucală sau din epiteliul vaginal, în care colorează intens cu cresyl violet și dă o reacție Feulgen pozitivă.

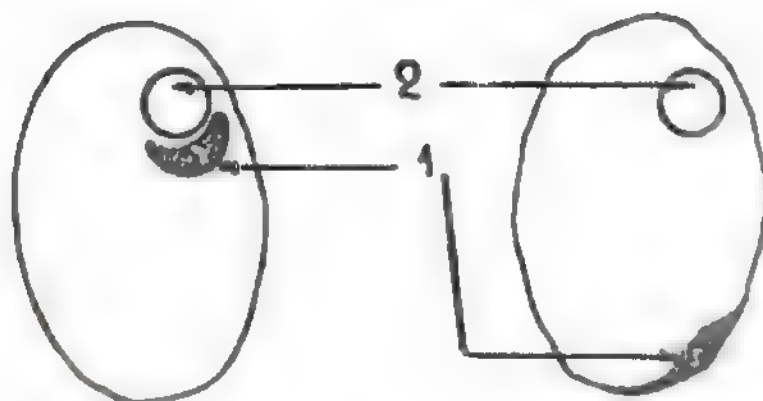


Fig. 21. Localizarea cromatinei sexuale.

1. corpuscul Barr; 2. nucleol

În microscopia electronică cromatina apare sub forma unor fibrile de 20 Å grosime care se spiralizază formînd complexe cromatiniene. Unitățile din care sînt formate aceste complexe se numesc fibre cromatiniene sau cromoneme.

Molecula de A.D.N. bicatenar se înfășoară pe niște particule de proteine-histone numite nucleosomi și formează un nucleofilament: acesta suferă o spiralizare care duce la formarea unei cromoneme cu diametrul de 250 Å.

Cromatina conține aproximativ 98% din totalitatea de A.D.N. celular (2% A.D.N. se găsește în mitocondrii). Prezența lui în nucleu este demonstrată cu ajutorul reacției Feulgen sau verde de metil-pironină.

12.5.3. Nucleolul

Nucleolul este un organit responsabil de sinteza acizilor ribonucleici, ribozomali, prezent în nucleii interfazici, absent în timpul mitozei.

În microscopia optică el apare sub forma unei granule refringente, sferice sau ovale, înconjurată mai mult sau mai puțin de un inel de cromatină.

Fiecare nucleu conține 1-2 sau mai mulți nucleoli, care se colorează în roșu cu tehnica verde de metil-pironină.

Raportul dintre nucleu și nucleol (N/n) se modifică în favoarea nucleolilor ori de cîte ori celula este hiperactivă (în timpul sintezei proteinelor de structură sau a proteinelor metabolice). (Fig. 22).

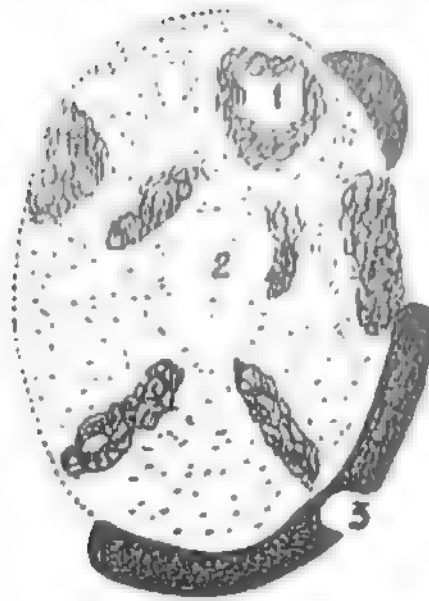


Fig. 22. Ultrastructura nucleolului

1. pars fibrosa ; 2. pars granulosa; 3. pars cromosoma

La microscopul electronic, nucleolul apare format din :

+ structuri fibrilare cu un diametru de 40-80 Å și cu o lungime de 200-400 Å, avînd o densitate electronică identică cu a fibrelor cromatinice.

+ granulele cu un diametru de 150 Å și care se aseamănă cu ribozomii : au o zonă periferică densă și una centrală mai clară.

+ cromatina alcătuită din fibre cromatinice dispuse la periferia nucleolului și care pătrund uneori în structura lui; bogat în A.D.N. , acest material cromatinian intră în alcătuirea unor segmente de cromozomi cu rol în organizarea materialului nucleolar;

+ pars amorfa este o zonă puțin densă la fluxul de electroni.

(12.5.4. Carioplasma

Carioplasma sau sucul nuclear este formată dintr-o masă fluidă slab bazofilă și care scaldă cromatina și nucleolul.

13* ORGANITE SI INCLUZIUNI CELULARE

13.1. I n t r o d u c e r e

Organitele celulare reprezintă diferențieri structurale ale citoplasmei care îndeplinesc funcții deosebit de importante.

Din punct de vedere structural, organitele se împart în :

1. organite cu structură membranară din care fac parte : reticulul endoplasmatic, mitocondriile, complexul Golgi, lizozomii și peroxizomii;

2. organite fără structură membranară în care se includ : ribozomii, centrozomul, microtubii și microfilamentele.

13.2. R i b o z o m i i

Ribozomii sau corpusculii lui Palade (1953) sînt particule submicroscopice compacte, constituite din ribonucleoproteine.

La microscopul electronic ei apar sub forma unor granule ovalare sau elipsoidale cu diametrul mare de aproximativ 200 Å și cel mic de 160 -170 Å .

Cu ajutorul tehnicilor de colorare negativă se pune în evidență un șanț transversal, perpendicular pe axul mare al particulei, care împarte ribozomul în două subunități inegale ca dimensiuni și structură.

Ribozomii se găsesc fie acolați de fața externă a membranelor reticulului endoplasmatic, fie liberi în hialoplasmă și au rol în sinteza de proteine prin asamblarea acizilor aminați într-o ordine dinainte stabilită:

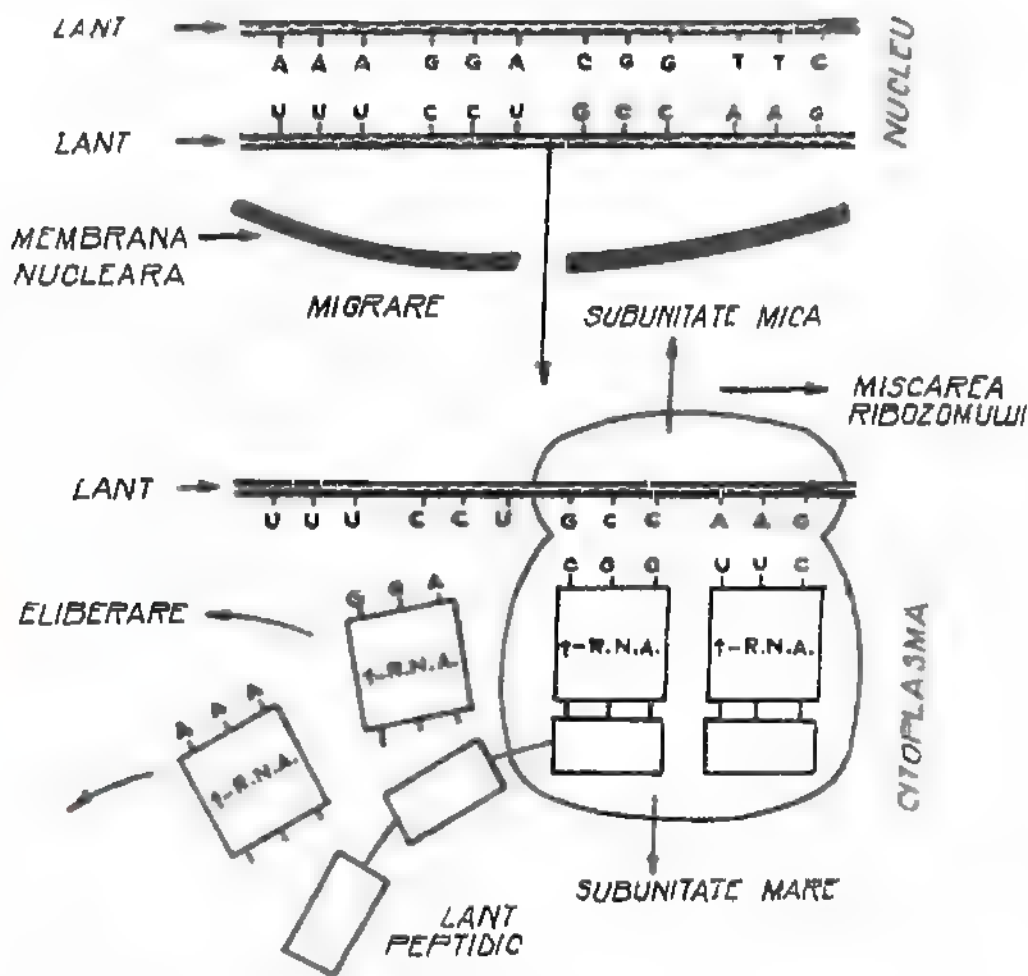


Fig. 23. Reprezentarea schematică a ribozomului

13.2.1. Polizomii sau poliribozomii sînt formațiuni constituite dintr-o moleculă de acid ribonucleic mesager (A.R.N.m) pe care se fixează mai mulți ribozomi.

Poliribozomii reprezintă unitățile funcționale elementare la nivelul cărora se derulează sinteza de proteine în celulă.

Poliribozomii liberi din hialoplasmă sintetizează proteinele necesare activităților celulare pe când polizomii legați de membrană sintetizează proteinele care vor fi excretate.

13.2.2. Biosinteza ribozomilor

Ribozomii iau naștere prin unirea acidului ribonucleic (A.R.N.r) cu o proteină).

A.D.N.-ul nucleolar care joacă rolul de model și pe care vin să se fixeze moleculele destinate sintezei de A.R.N.r. reprezintă un segment din A.D.N.-ul unui cromozom localizat în organizatorul nucleolar.

În timpul formării ribozomilor, formare care are loc numai în cazul în care numărul lor din hialoplasmă a scăzut sub normal, precursorul (A.R.N. 45 s) este încorporat la o proteină împreună cu care formează o ribonucleoproteină cu un coeficient de sedimentare de 80 s.

13.3. M i t o c o n d r i i l e

Mitocondriile sînt organite prezente în toate celulele, a căror rol major este de a înmagazina sub formă de adenzintrifosfat energia eliberată prin oxidare enzimatică a moleculelor nutritive.

13.3.1. Morfologia în microscopia optică

a/ Forma mitocondriilor poate fi :

- + bastoniformă
- + granulară

Forma lor poate fi diferită de la un tip celular la altul sau chiar de la o celulă la alta. În enterocite, mitocondriile au o dispoziție bipolară : la polul apical ele au formă de bastonașe în timp ce la polul bazal au un aspect granular.

b/ Talia mitocondriilor este și ea un element variabil. În hepatocite, nefrocite, ele măsoară aproximativ 3 microni lungime și 0,5 - 1 microni grosime, iar în fibrele musculare ajung la 8 microni lungime.

c/ Numărul mitocondriilor dintr-o celulă variază în funcție de necesitățile energetice de care are nevoie. În hepatocite, nefrocite, numărul lor este mare față de adipocite, limfocite, unde numărul lor este redus.

d/ Distribuția lor în citoplasmă nu este fixă, ele îndreptându-se spre regiunile în care celula are mai multă nevoie de energie : perinuclear, în vecinătatea plasmalemei lângă reticulul endoplasmatic rugos.

În tubii renali ele sînt dispuse în regiunea bazală a nefrocitelor deoarece eliberarea de energie este utilizată de membrană în vederea transportului activ de substanță; în hepatocite sînt dispuse de-a lungul axului care unește polul vascular cu cel biliar; în celulele ciliate se găsesc în apropierea centrului cinetic al cilului sau corpusculul bazal.

13.3.2. Ultrastructura mitocondriilor

În microscopia electronică, mitocondriile au o



Fig. 24. Reprezentarea schematică în M.E. a

mitocondriei. 1.membrana externă; 2.membrana internă;

3.camera externă; 4.camera internă cu matricea;

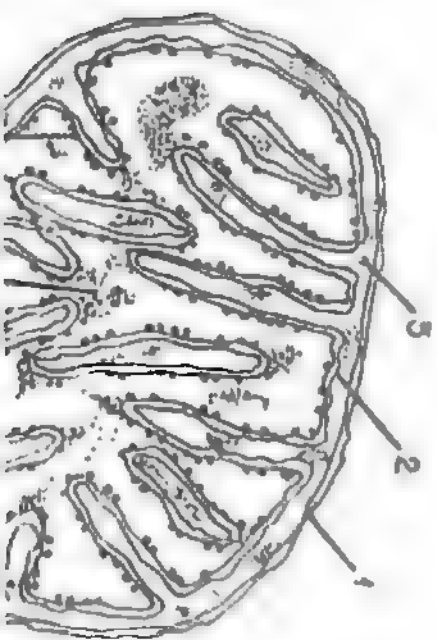
5.crește mitocondriale.

b/ o membrană internă de 50-70 Å grosime, trilaamelată, care trimite expansiuni digitiforme în interiorul mitocondriei, formațiuni numite crește mitocondriale;

c/ camera externă este spațiul cuprins între membrana internă și cea externă, larg de 40-70 Å și care comunică cu lumenui creștelor mitocondriale; este puțin densă la fluxul de electroni;

formă sferică, alungită sau contorsionată. În structura lor intră (fig. 24) :

a/ o membrană externă de 50-70 Å grosime, tri-lameletă, netedă pe fața sa internă ; fața sa externă emite din loc în loc proiecții rare și scurte;



d/ camera internă este spațiul limitat de membrana internă și cuprins între crestele mitocondriale; este ocupat de granule fine a căror densitate electro-microscopică variază în funcție de starea funcțională a organitului.

Matricea mitocondrială care ocupă camera internă, conține în mod constant:

- + molecule de A.D.N. (2% din cantitatea totală)
- + mitoribozomi (acid ribonucleic mitocondrial-A.R.N.mt) vizibili după colorații negative;
- + granulații dense, neregulate, de aproximativ 500 Å diametru, reprezentând acumulări de cationi.

13.4. R e t i c u l u l e n d o p l a s m a t i c

Reticulul endoplasmatic este un organit care apare sub forma unor canalicule și cisterne, limitate de membrana de natură lipoproteică cu grosime de 50-60 Å. El îmbracă două forme care comunică una cu cealaltă dar care diferă prin structură și funcții:

a/ reticulul endoplasmatic granular (R.E.G.)
care prezintă pe fața externă a membranelor sale ribozomi;

b/ reticulul endoplasmatic neted (R.E.N.)

Diferențierea morfologică și funcțională dintre cele două forme se face numai cu ajutorul microscopului electronic. (Fig.25).

Canaliculele reticulului endoplasmatic (cu un diametru cuprins între 50-500 Å), sînt dispuse sub forma unei rețele sau labirint canalicular.

La locul de întretăiere formează niște dilatații sau cisterne care pot ajunge la 2000 Å diametru.

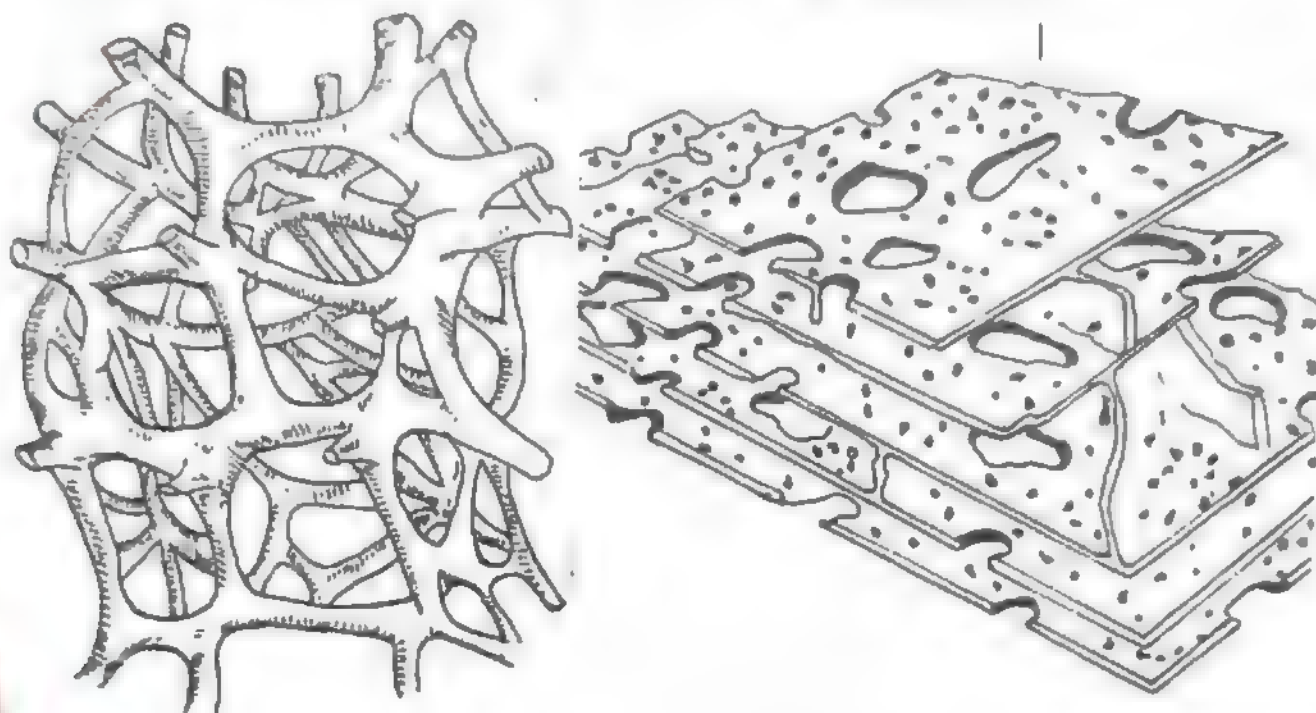


Fig.25. Reprezentarea schematică în M.E. a :
1. R.E.N.; 2. R.E.G.

Reticulul endoplasmatic face legătura între membrana plasmatică și foița externă a membranei nucleare constituind un sistem circulator intracitoplasmatic.

Poziția reticulului endoplasmatic diferă în raport de funcțiile tipului celular studiat. De exemplu, în celulele glandulare ale acinilor pancreaticei, în parotidă sau glanda submaxilară, reticulul endoplasmatic ocupă segmentul bazal al citoplasmei. În hepatocite, sacii ergastoplasmici au o dispoziție concentrică cunoscută sub numele de corpii lui Berg. În celulele nervoase (motoneuronii din coarnele anterioare ale măduvei spinării), sacii ergastoplasmici se reunesc în teritorii de dimensiuni mici care corespund corpusculilor lui Nissl din microscopia optică.

13.5. Complexul Golgi

Complexul Golgi este un organit format din unități elementare reprezentate prin cisterne turtite, fenestrate, care joacă un rol principal în transformarea și ambalarea proteinelor elaborate de reticulul endoplasmatic, în sinteza glicoproteinelor și a mucopolizaharidelor (M.P.Z.).

13.5.1. Morfologia în microscopia optică.

a/ Forma complexului Golgi este extrem de variată de la un tip celular la altul; chiar în aceeași celulă forma lui variază în raport de ciclul funcțional. Pe preparatele impregnate cu azotat de argint sau tetroxid de osmiu, el apare sub forma unei rețele dispuse în vecinătatea nucleului.

b/ Dimensiunile complexului Golgi diferă și ele în raport de tipul celular precum și de ciclul ei funcțional (este foarte bine reprezentat în celulele glandei mamare în lactație); este foarte dezvoltat în celulele glandulare și nervoase și redus în fibrele musculare netede.

c/ Poziția este relativ fixă pentru fiecare tip celular. De exemplu în celulele cu secreție exocrină, complexul Golgi este situat între nucleu și polul apical pe când în celulele endocrine el este situat între nucleu și polul bazal. El mai poate ocupa când unul sau celălalt pol, indicând de fiecare dată polul secretor al celulei - „valsul complexului Golgi” - (celulele foliculare tiroidiene.

13.5.2. Morfologia în microscopia electronică

Complexul Golgi cuprinde două forme de organizare:

- + dihtiozomi;
- + cisterne sau vezicule

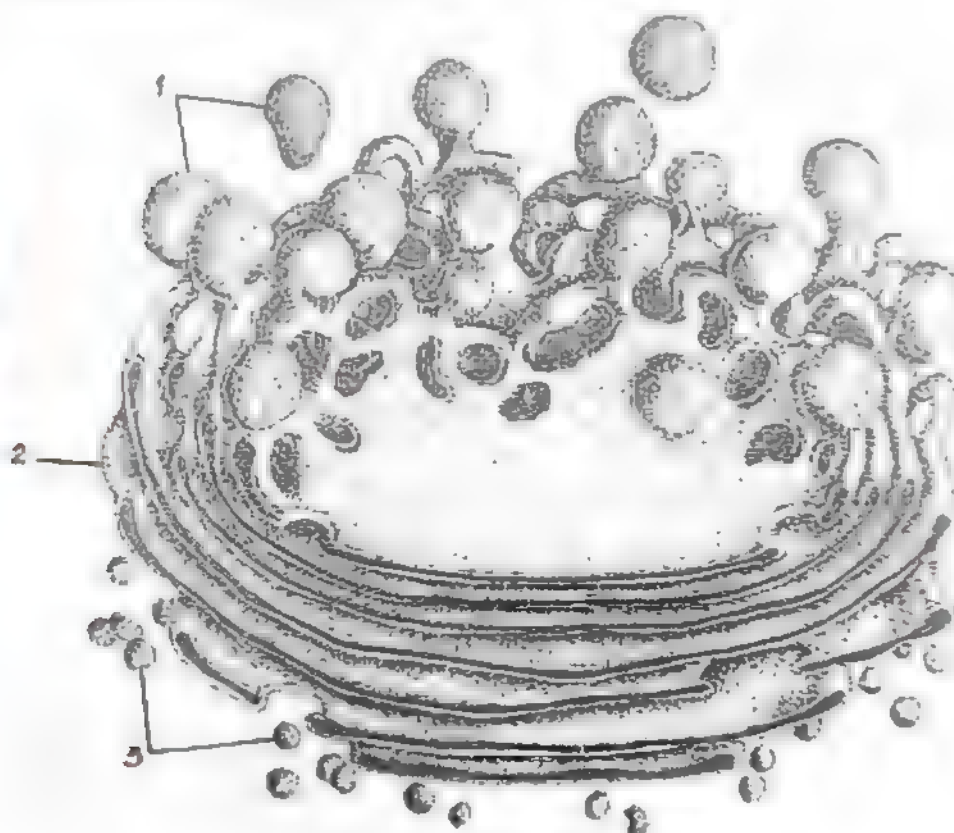


Fig.26. Reprezentarea schematică a complexului Golgi: 1.-vezicule de secreție părăsind fața de formare; saci 2.-caci; 3.- vezicule de transfer.

a/ Dihtiozomul este format din pachete de saci aplatizați ; fiecare din ei au un lumen de 60-80 Å limitat de o membrană netedă cu o grosime de 50-65 Å .

Sacii golgieni sînt dispuși paralel, separați

între ei prin spații de 35-80 Å .

Fiecare dihtiozom are două fețe:

+ o față de formare (față imatură sau proximală) convexă, în raport cu învelișul nuclear sau cu membranele reticulului endoplasmatic;

+ o față de maturare sau distală , concavă, spre care se îndreaptă cisternele sau veziculele formate la extremitățile sacilor aplatizați; este îndreptată spre polul de excreție al celulei.

b/ Cisternele sau veziculele, mai mari sau mai mici (300-5000 Å) au un conținut puțin dens la fluxul de electroni în momentul desprinderii de extremitățile sacilor aplatizați ai dihtiozomului; odată cu migrarea lor către fața de maturare a complexului Golgi, conținutul lor devine din ce în ce mai dens la fluxul de electroni (faza de maturare).

13.6. L i z o z o m i i

Sînt organite celulare care se observă numai în microscopia electronică. Au o formă sferică iar conținutul lor este bogat în enzime hidrolitice.

a/ Membrana lizozomului are o structură trilamelată, dublată spre interior de o pătură glicoproteică rezistentă la acțiunea conținutului enzimatic; ea asigură lizozomului o latență enzimatică.

b/ Matricea lizozomală apare la unii dintre ei granulară (lizozomi primari cu un diametru de 0,3-0,1 microni) iar la alții se pot observa în interior fragmente de membrană, de mitocondrii, fagozomi, etc. (lizozomi

secundari).

După natura materialului atacat de enzime, lizozomii secundari se clasifică în :

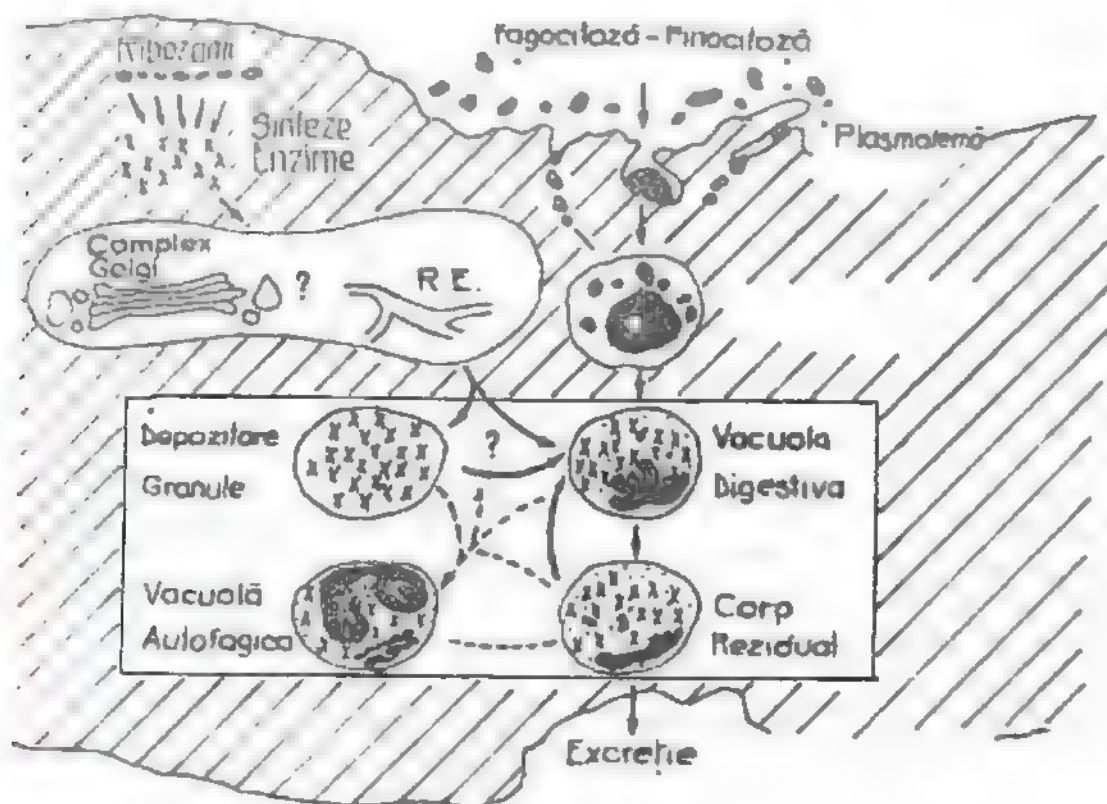


Fig.27. Reprezentarea schematică a formării lizozomilor și digestia celulară.

1. heterolizozomii care rezultă din fuzionarea lizozomilor primari cu fagozomii sau vacuolele de pinocitoză;

2. autolizozomii când enzimele lizozomale distrug structurile proprii ale celulei;

3. corpii reziduali sînt vacuole provenite dintr-un heterolizozom sau autolizozom în care persistă reziduri nedigerate de enzime lizozomale (figurile mielinice) ;

4. crinolizozomi rezultă prin fuziunea granulelor de secreție celulară destinate exportului, cu enzimele lizozomilor;

5. corpui multiveziculari sînt o varietate de lizozomi care conțin în matrice numeroase vezicule mici în care se desfășoară o intensă activitate fosfatazică.

13.7. P e r o x i z o m i i

Sînt organele celulare submicroscopice ce au un bogat conținut enzimatic, în special peroxidaze.

a/ Membrana care limitează la periferie conținutul peroxizomului, de 60-80 Å grosime, are o structură asemănătoare plasmalemei;

b/ Matricea este omogenă sau fin granulară, moderat densă la fluxul de electroni; conține uneori filamente ramificate.

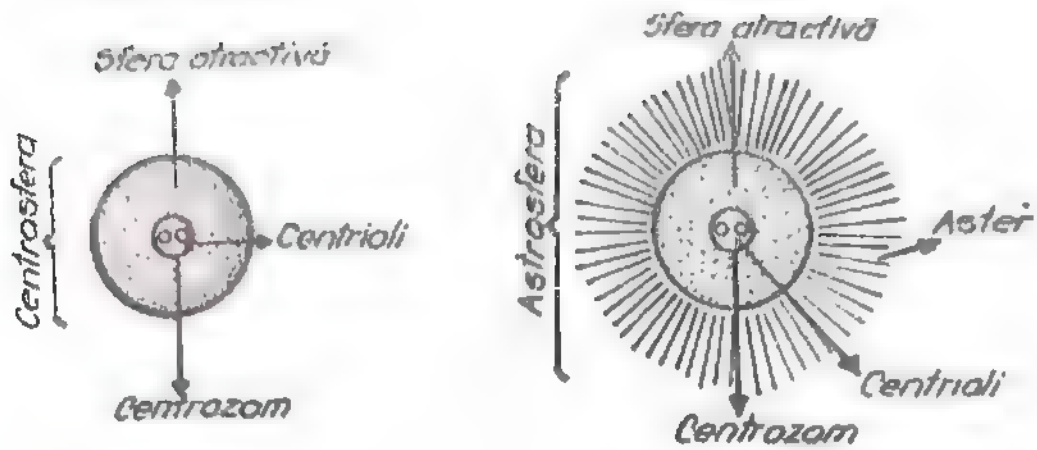
Placa marginală este un element constant la toate speciile de mamifere; este liniară și se găsește la periferia peroxizomului.

13.8. C e n t r u l c e l u l a r (centrozomul)

Este un organit de dimensiuni mici, vizibil atât în microscopia electronică cît și în cea optică; este prezent în toate celulele care se divid, fiind observat mai bine în timpul desfășurării acesteia.

13.8.1. Morfologia în microscopia optică

Centrul celular prezintă aspecte diferite în raport de faza ciclului celular.



A

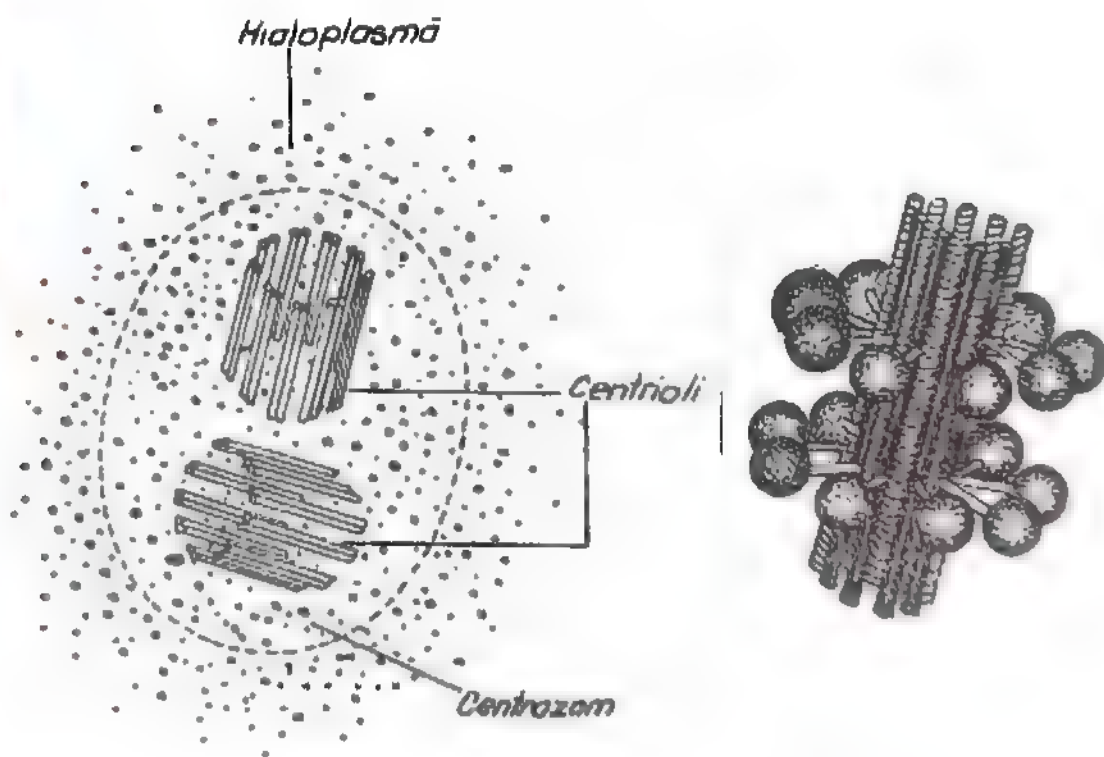


Fig.28. Centrul celular: a/ în microscopia optică; b/ în microscopia electronică



În interfază el are forma unei granule numită centrozom în interiorul căruia se află 1-2 corpusculi sau centrioli (în cazul în care există doi centrioli, formațiunea se numește diplozom).

Aceste formațiuni sînt înconjurate de o masă de citoplasmă mai densă numită centrosferă.

La periferia centrului celular se găsește asterul constituit din elemente fibrilare fine care se dispun radial în raport cu centrosfera.

Ansamblul centrosferă - aster se numește astro-sferă.

13.8.2. Ultrastructura centrului celular

Centriolul are forma unui cilindru de 0,15-0,25 microni lungime și 200-260 Å lărgime, a cărui perete este format din nouă grupe de cîte trei tubi sau triplete.

Fiecare tub este alcătuit din 13 microfilamente de 45 Å diametru, dispuse împrejurul unei cavități centrale clare.

Centrul extremității distale a centriolului (orientat către periferia celulei) este ocupat de un cilindru din material opac către care converg linii dense la fluxul de electroni; ele pornesc de la fața internă a unui tub din fiecare triplet.

13.9. M i c r o t u b i i

Microtubii sînt formațiuni cilindrice, alungite, cu un diametru de aproximativ 250 Å care intervin în menținerea formei celulelor, în transportul de substanțe, în mobilitatea celulei, etc.

Ei au un perete dens la fluxul de electroni, gros de 50 Å și o cavitate axială puțin densă electromicroscopic largă de 140 ± 150 Å.

13.10. M i c r o f i l a m e n t e l e

Sînt organite celulare submicroscopice, jucînd un rol important în fenomenele de endo și exocitoză, precum și în timpul diviziunii celulare.

13.11. I n c l u z i u n i l e c e l u l a r e

În citoplasma celulelor se pot găsi incluziuni care reprezintă produse de elaborare ale complexului Golgi, substanțe captate din mediul extracelular și reținute de celule sau produse de dezasimilație.

Spre deosebire de organitele celulare care au un caracter permanent, incluziunile celulare au un caracter temporar.

În celulă iau diferite forme și în microscopia optică se pot evidenția prin folosirea tehnicilor de citochimie.

Incluziunile pot fi formate din :

- + substanțe proteice;
- + grăsimi ;
- + glicogen;
- + substanțe minerale (fier-siliciu) și vitamine;
- + granule de secreție - zimogen
- mucus
- + pigmenți (melanină).

14. DIVIZIUNEA CELULARĂ

14.1. Introducere

În biologia celulară diviziunea este unul din fenomenele cele mai complexe.

Toate celulele cu excepția celor nervoase sînt capabile de a se divide, adică de a forma două celule fiice, cu aceleași caractere morfologice și funcționale ca și celula mamă.

Prin diviziunea celulară se realizează atât un proces de creștere și diferențiere a organismelor cît și reproducerea lor.

La om multiplicarea celulară se face prin:

- + diviziunea indirectă, cariokineză sau mitoză
- + diviziunea directă sau amitoza.

14.2. Mitoza

Diviziunea indirectă sau mitoza interesează:

- + toate elementele nucleare;
- + toate elementele citoplasmatiche.

Ea se caracterizează prin :

④ spiralizarea cromozomilor care se separă în vederea repartizării lor în număr egal între cele două celule fiice ;

+ aparitia în citoplasmă a unui mănunchi de microtubi care îndrumă mișcarea cromozomilor.

Mitoza prezintă două forme :

- 1) a/ mitoza somatică sau mitoza propriu-zisă

care interesează celulele somatice (homeotipică, ecuațională);

b/ mitoza redukțională sau meioza, care interesează numai celulele sexuale (heterotipică).

I 14.2.1. Mitoza somatică

Desfășurarea mitozei se face în patru stadii: profaza, metafaza, anafaza și telofaza.

14.2.1.1. Profaza (P)

a/ Fenomenele nucleare se caracterizează prin aparitia cromozomilor. La început subțiri, cromozomii se îngroașă prin spiralizarea cromonemelor. Centromerul sau kinetocorul a cărui poziție este constantă pentru fiecare cromozom, devine vizibil.

Cromozomii se apropie de învelișul nuclear lăsând un spațiu centro-nuclear gol.

b/ Fenomenele citoplasmatiche se caracterizează prin îndepărtarea celor doi centrioli ai diplozomului. Între ei apar microtubi care formează fusul de diviziune.

Mitocondriile se fragmentează.

Înainte începerii celei de a doua faze, nucleolul și membrana nucleară dispar iar cromozomii migrează către regiunea ecuatorială a celulei; ei stabilesc contact cu microtubii fusului de diviziune care se inseră la nivelul centromerului.

14.2.1.2. Metafaza

Cromozomii se scurtează prin accentuarea spiralizării și se găsesc pe un plan care trece prin mijlocul celulei formând placa ecuatorială, perpendiculară pe direcția fusului de diviziune.

Cromozomii își orientează cromatidele către periferia celulară, placa ecuatorială fiind formată din centromerele cromozomilor pe care se fixează microtubii fusului de diviziune.

Suprafața celulară prezintă mișcări de fierbere.

Centromerul fiecărui cromozom precum și fiecare cromatidă încep să se cliveze longitudinal.

14.2.1.3. Anafaza

Se caracterizează prin separarea completă a celor două centromere și cromatide fiice și migrarea fiecărui cromozom nou format către ambii poli ai celulei.

În a doua jumătate a anafazei, în zona de citoplasmă care separă cele două grupe de cromozomi se găsesc microtubii fusului de diviziune care iau denumirea de microtubi interzonali.

Cele două grupe de cromozomi se găsesc la cei doi poli ai celulei.

14.2.1.4. Telofaza

Cromozomii se despiralizează și devin foarte subțiri (cromoneme).

Se constituie membrana nucleară și la sfârșitul

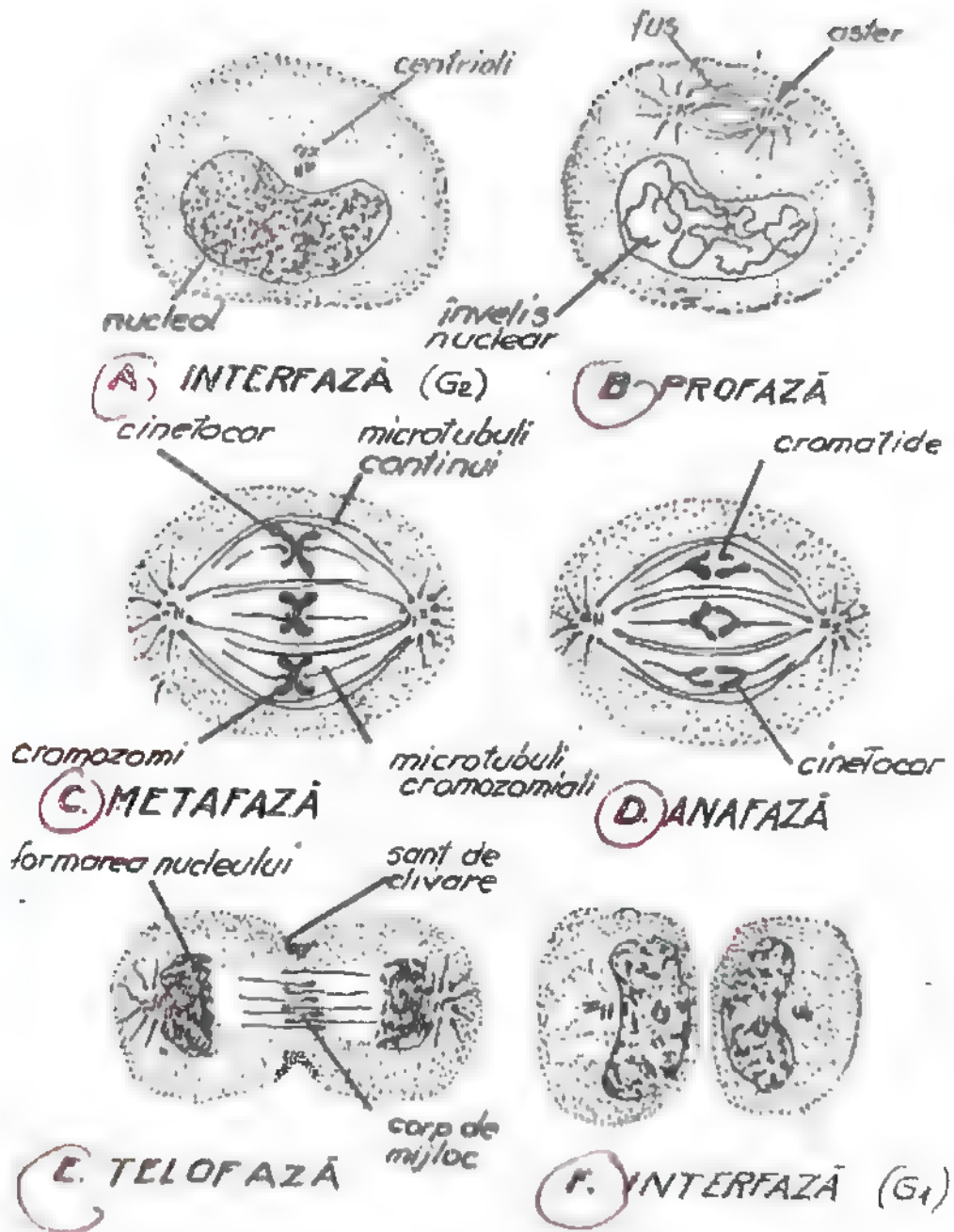


Fig.23. Reprezentarea schematică a etapelor mitozei somatice

telofazei apar nucleolii (din organizatorii nucleari).

În tot acest timp, partea mijlocie a celulei mamă se strângulează ; microtubulii interzonali ai fuziunii de diviziune din această zonă, formează un fel de membrană care separă viitoarele celule fiice.

Toate organele celulare se repartizează aproximativ în mod egal între cele două celule fiice.

Mișcările periferice diminuează progresiv până la dispariție iar cele două celule fiice se separă complet.

14.3. Meioza *miterea reducțională*

Celulele sexuale mature sau gameții se formează în urma unui tip special de diviziune care poartă numele de meioză. Meioza cuprinde două diviziuni succesive:

① meioza propriu-zisă sau diviziunea reducțională în urma căreia numărul diploid de cromozomi (46 sau $2N$) este redus la jumătate (formulă cromozomială haploidă, 23 sau N).

② diviziunea de maturare, ecuațională, care conservă numărul haploid de cromozomi.

14.3.1. Diviziunea reducțională

Se derulează patru faze : profaza, metafaza, anafaza și telofaza. Caracteristică este profaza care se desfășoară în cinci etape:

- ① leptoten;
- ② zigoten ;
- ③ pahiten ;
- ④ diploten;
- ⑤ diakineta.

14.3.1.1.

Profeza

I

1. Stadiul leptoten începe o dată cu creșterea în volum a nucleului, replicarea A.D.N.-ului cromozomial și diferențierea cromozomilor care se găsesc în număr diploid.

2. Stadiul zigoten se caracterizează prin acolearea longitudinală a cromozomilor omologi (fiecare autozom de origine maternă se acolează la autozomul omolog de origine paternă. O astfel de pereche ia numele de cromozomi bivalenți sau diadă.

La sfârșitul acestei faze se găsesc 22 cromozomi bivalenți, deci s-a efectuat reducerea la jumătate a garniturii cromozomiale.

Cromozomii sexuali (xy sau xx) alcătuiesc o formațiune cunoscută sub numele de veziculă sexuală.

3. Stadiul pahiten. La nivelul fiecărei cromatide din diadă apare un clivaj longitudinal care determină apariția a două cromatide paralele. În urma acestui clivaj, fiecare bivalent va avea patru cromatide alcătuind o tetradă.

În această fază are loc un schimb de material genetic între cromatidele de origine paternă și cele de origine maternă, schimburi realizate prin legături chiazmatice, (crossing over).

4. Stadiul diptoten se caracterizează prin separarea cromozomilor omologi din fiecare bivalent, ei rămânând legați numai la nivelul chiazmelor.

5. Stadiul de diakineză. Cromozomii bivalenți migrează spre periferia nucleului, legaăturile lor

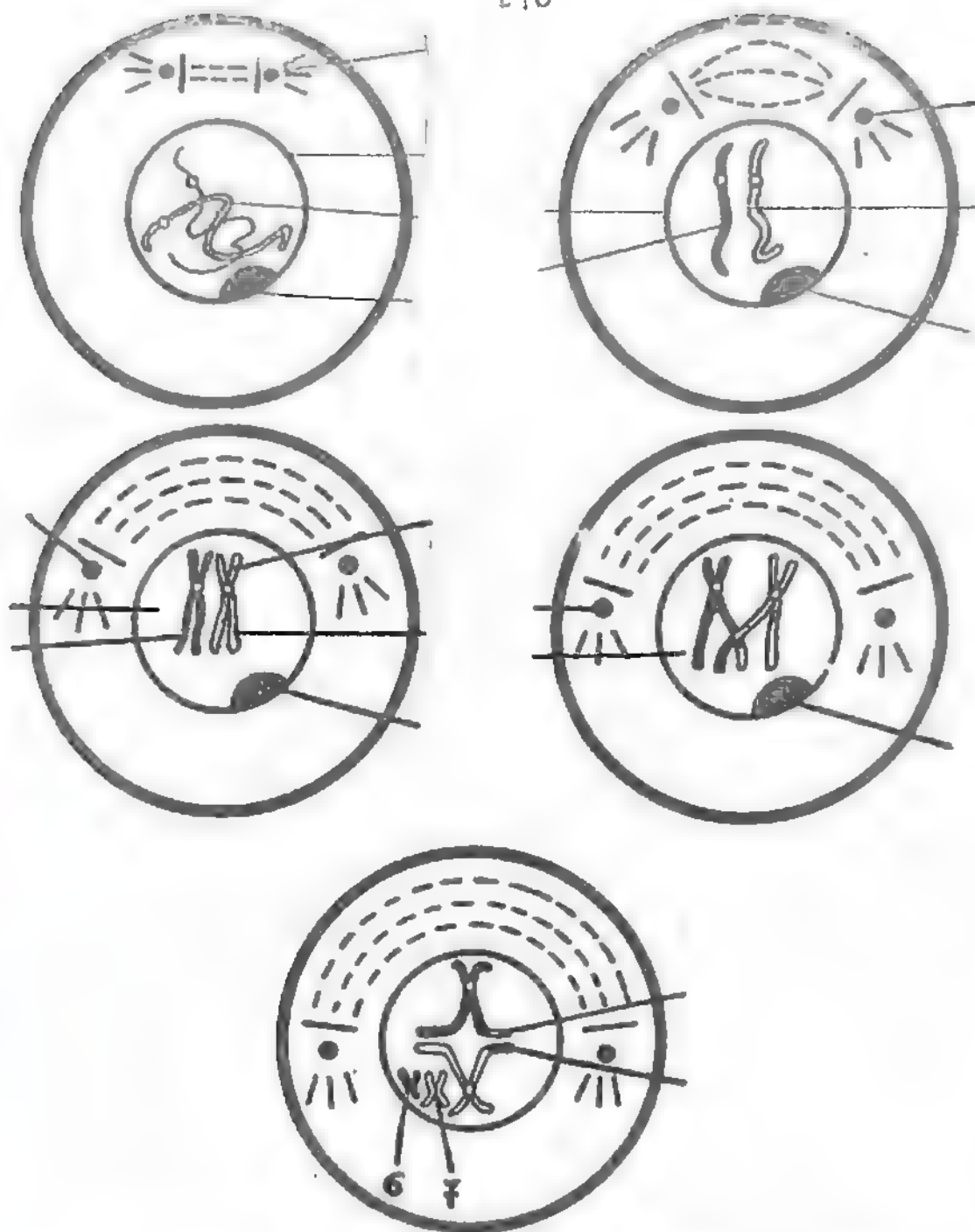


Fig.30. Reprezentarea schematică a profazei meiozei. 1.-centrioli; 2.-nucleu; 3.-autozom matern; 4.-autozom patern; 5.-vezicula sexuală; 6.-gonosom Y; 7.-gonosom X; 8.-material genetic matern; 9.-material genetic patern.

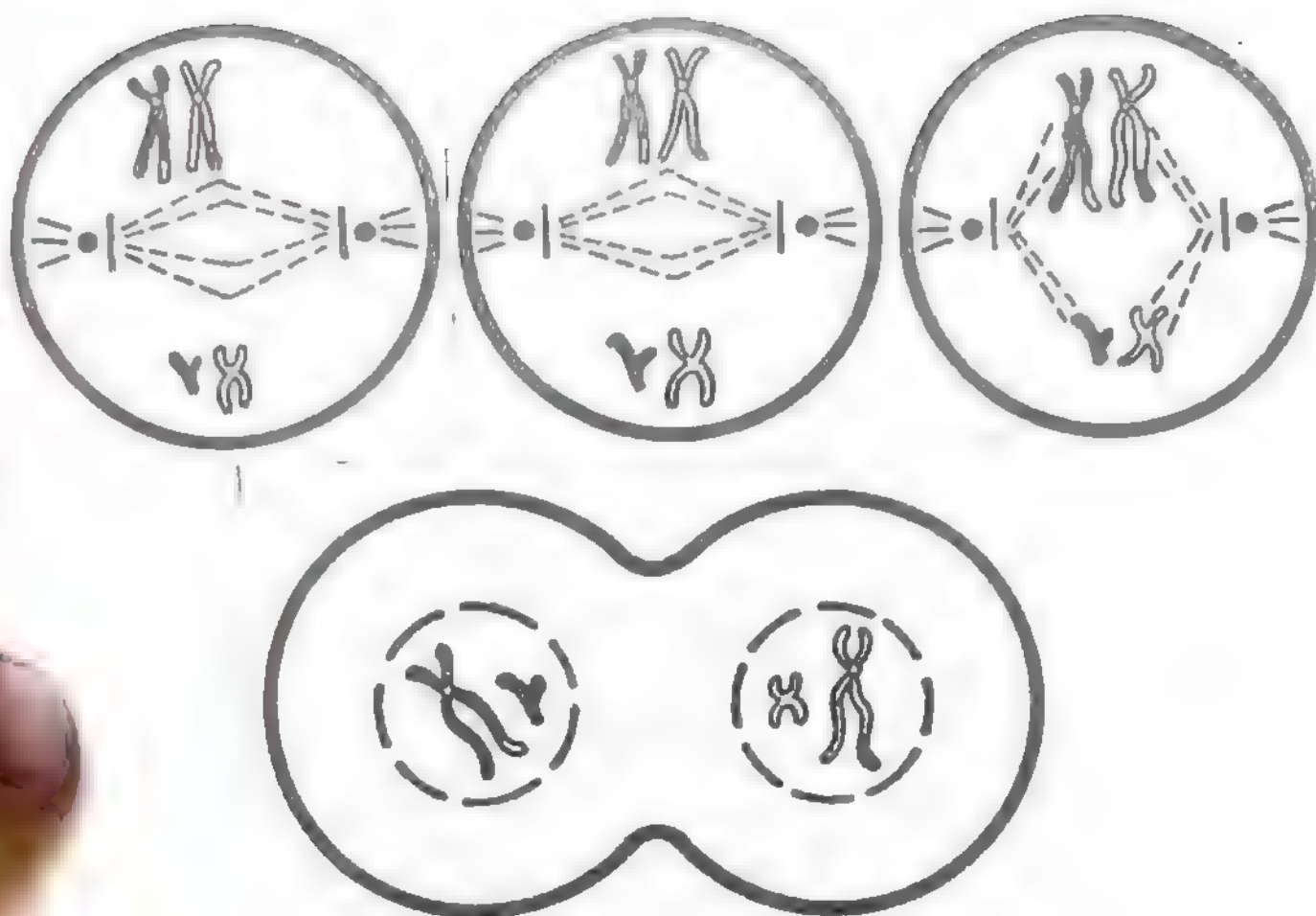


Fig. 31. Următoarele faze ale meiozei

A.-premetafaza; B.-metafaza; C.- anafaza; d.-telofaza

chiazmatice reducându-se, foarte mult. Se individualizează cromozomii sexuali (xy sau xx). Dispare nucleolul iar membrana nucleară se dezintegrează. (Fig.24).

14.3.1.2. Metafaza

Cromozomii ocupă planul ecuatorial al celulei iar pe fiecare centromer se inseră microtubii fusului de diviziune.

14.3.1.3. Anafaza

Cromozomii din fiecare bivalent se separă, feno-

menul denumit disjuncție și migrează spre poli celulei.

14.3.1.4. Telofaza

Marchează începutul formării celor două celule fiice a spermatocitelor și ovocitelor II, cu echipamentul cromozomial redus la jumătate (formulă haploidă, $N = 23$ cromozomi).

14.3.2. Diviziunea de maturatie

Este o mitoză obișnuită, ecuațională, în care nu mai are loc replicarea A.D.N.-ului. În urma acestei diviziuni de maturare rezultă gameții apți pentru fecundare care conțin același număr haploid de cromozomi ca și celulele din care au luat naștere.

14.4. A m i t o z a s a u d i v i z i u n e a d i r e c t ă

Prin diviziunea directă se formează două celule fiice prin simpla strangulare a nucleului și a citoplasmei celulei mame, fără apariția cromozomilor.

Se întâlnește în hepatocite, celule cartilagi-noase și osoase, etc.

În unele cazuri (hepatocite) diviziunea nucleului nu este însoțită și de împărțirea citoplasmei, ducând la apariția celulelor binucleate.

Tot în acest mod iau naștere și plasmodiile.

T A B L A D E M A T E R I I

1. - METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC IN MICROSCOPIA FOTONICA

1.1. - Introducere	1
1.2. - Recoltarea pieselor	5
1.3. - Fixarea și fixatorii citologici	6
1.4. - Oprirea fixării	11
1.5. - Includerea în parafină	11
1.6. - Secționarea blocurilor	14
1.7. - Lipirea secțiunilor pe lamă	14

2. - COLORAREA SI COLORANTI IN CITOLOGIE

2.1. - Introducere	17
2.2. - Coloranți	17
2.3. - Clasificarea coloranților	18
2.4. - Mecanismele colorării	19
2.5. - Principalele metode de colorare	20
2.6. - Colorarea cu hematoxină - eozină	21

3. - METODE PENTRU EXAMENUL IN MICROSCOPIA FOTONICA

3.1. - Frotiul	23
3.2. - Frotiul de sânge	23
3.3. - Frotiurile din material biologic provenit din organe ușor accesibile	28
3.4. - Frotiurile cu material biologic provenit din organe mai puțin accesibile	29

3.5.	- Amprentele de organe	29
4.	- <u>METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC</u> <u>IN MICROSCOPIA FOTONICA</u>	
4.1.	- Indicațiile secționării la gheață și criotom	31
4.2.	- Tehnica secționării la microtomul de congelare	32
4.3.	- Colorarea pentru examenul extemporaneu..	33
4.4.	- Lipirea secțiunilor	34
4.5.	- Tehnica secționării la criotom . . .	34
4.6.	- Criodesicarea	35
4.7.	- Metoda de congelare - substituție . .	36
5.	- <u>METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC</u> <u>IN MICROSCOPIA ELECTRONICA</u>	
5.1.	- Introducere	38
5.2.	- Prelevarea	39
5.3.	- Fixarea	40
5.4.	- Deshidratarea	41
5.5.	- Includerea	42
6.	- <u>METODE PENTRU EXAMENUL CITOLOGIC</u> <u>IN MICROSCOPIA ELECTRONICA</u>	
6.1.	- Secționarea	45
6.2.	- Fasonarea blocului	46
6.3.	- Aplicarea secțiunilor pe port-obiect..	49
6.4.	- Contrastare	52
7.	- <u>METODE CURENTE DE CITOCHEMIE</u>	
7.1.	- Introducere	54
7.2.	- Recoltarea pieselor	54
7.3.	- Fixarea	54

7.4. - Includerea	56
7.5. - Secționarea	57
7.6. - Lipirea secțiunilor	57
7.7. - Reacțiile pentru evidențierea substanțelor	57
7.7.1.-Evidențierea histochimică a unor substanțe minerale	58
7.7.2.-Evidențierea histochimică a glucidelor..	59
7.7.3.-Evidențierea histochimică a lipidelor...	60
7.7.4.-Evidențierea histochimică a proteinelor..	61

8. - METODE CURENTE DE CITOENZIMOLOGIE

8.1. - Introducere	63
8.2. - Metode citoenzimologice	64
8.3. - Metode biochimice	68

9. - CULTURI DE CELULE

9.1. - Introducere	72
9.2. - Condiții materiale de lucru	73
9.3. - Mediile de cultură	74
9.4. - Clasificarea culturilor	76
9.5. - Tehnica culturii celulare	77

10.- FRACTIONAREA CELULARA

10.1.- Introducere	82
10.2.- Omogenizarea țesuturilor	85
10.3.- Studiul fracțiunilor celulare	89

11. - CELULA

11.1.	- Introducere	92
11.2.	- Forma celulelor	94
11.3.	- Dimensiunile celulelor	95
11.4.	- Numărul celulelor	97
11.5.	- Invelișul celulelor	97
11.5.1.-	Plasmalema	97
11.5.2.-	Glicocalixul	98
11.6.	- Specializările plasmalemei	100

12. - NUCLEUL IN INTERFAZA

12.1.	- Introducere	107
12.2.	- Forma nucleului	108
12.3.	- Dimensiunile nucleului	109
12.4.	- Numărul nucleilor	110
12.5.	- Structura nucleului în interfază... .	111
12.5.1.-	Invelișul nuclear	111
12.5.2.-	Cromatina	113
12.5.3.-	Nucleolul	116

13. - ORGANITE SI INCLUZIUNI CELULARE

13.1.	- Introducere	119
13.2.	- Ribozomi	119
13.3.	- Mitocondriile	121
13.4.	- Reticulul endoplasmatic	124
13.5.	- Complexul Golgi	126
13.6.	- Lizozomi	128
13.7.	- Peroxizomi	130

13.8. - Centrul celular	130
13.9. - Microtubli	132
13.10. - Microfilamentele	133
13.11. - Incluziunile celulare	133

14. - DIVIZIUNEA CELULARA

14.1. - Introducere	134
14.2. - Mitoza	134
14.2.1. - Mitoza somatică	135
14.2.2. - Meioza	138
14.3. - Amitoza	142

15. - <u>TABLEA DE MATERII</u>	143
------------------------------------------	-----